

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

25.07.01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年 8月 1日

REC'D 18 SEP 2001

WIPO PCT

出願番号
Application Number:

特願2000-233364

出願人
Applicant(s):

株式会社林原生物化学研究所

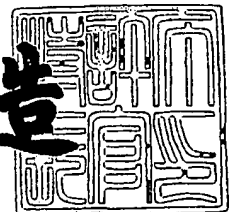
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2001年 8月31日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3077006

【書類名】 特許願
【整理番号】 10085401
【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿
【国際特許分類】

C12N 9/10
C12P 19/00
C12P 19/18
A23L 1/00
A23L 2/00
A61K 7/00
A61K 47/26

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 久保田 倫夫

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 津▲崎▼ 桂二

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 東山 隆信

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 福田 恵温

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物
化学研究所内

【氏名】 三宅 俊雄

【特許出願人】

【識別番号】 000155908

【氏名又は名称】 株式会社林原生物化学研究所

【代表者】 林原 健

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035736

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

【請求項2】 デキストラン生成能を有さず、EDTAによって活性が阻害される請求項1記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

【請求項3】 Ca^{2+} および Mn^{2+} でその活性が安定化および／または賦活化する請求項1または2記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

【請求項4】 非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる1種または2種以上の糖質である請求項1乃至3記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

【請求項5】 下記の理化学的性質を有する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

(1) 作用

非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合様式を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約117,000乃至160,000ダルト

ン

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、 pI 約4.7乃至5.7

(4) 至適温度

pH 6.0、60分間反応で、約40乃至45℃

1 mM Ca^{2+} 存在下では、約45乃至50℃

(5) 至適 pH

35℃、60分間反応で、 pH 約6.0乃至6.5

(6) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持で、約35乃至40℃まで安定

1 mM Ca^{2+} 存在下では、約40乃至45℃まで安定

(7) pH 安定性

4℃、24時間保持で、 pH 約4.5至10.0

【請求項6】 非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元性末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する作用を有し、配列表における配列番号1および5乃至7に示すアミノ酸配列から選ばれる1種または2種以上の配列を有する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

【請求項7】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が精製酵素または粗酵素であることを特徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素。

【請求項8】 請求項1乃至6のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能を有する微生物を栄養培地で培養して得られる培養物から、請求項1乃至7のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を採取することを特徴とする α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。

【請求項9】 微生物が、バチルス属の微生物である請求項8記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。

【請求項10】 バチルス属の微生物が、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9 (FERM BP-7143)、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11 (FERM BP-7144)、またはそれらの変異株である請求項9記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の製造方法。

【請求項11】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含有する溶液に、請求項1乃至7のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させ、 α -グルコシル転移反応させることを特徴とする α -グルコシル転移反応方法。

【請求項12】 請求項11記載の α -グルコシル転移反応に際し、D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-アラビノース、D-フコース、L-ソルボース、メチル- α -グルコース、メチル- β -グルコース、N-アセチルグルコサミン、トレハロース、イソマルトース、イソマルトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルクトール、ラクトース、およびスクロースから選ばれる1種または2種以上の受容体共存下で反応させて糖転移物を生成させることを特徴とする請求項11記載の α -グルコシル転移反応方法。

【請求項13】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含有する溶液に、請求項1乃至7のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させ、 α -グルコシル転移反応させ、 α -イソマルトシルグルコ糖質を生成させることを特徴とする α -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法。

【請求項14】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる1種または2種以上の糖質である請求項13記載の α -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法。

【請求項15】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含有する溶液に、請求項1乃至7の

いずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と、当該生成酵素で生成する α -イソマルトシルグルコ糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断しこの α -イソマルトシル部分を転移する α -イソマルトシル転移酵素とを作用させて得られるサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項16】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる1種または2種以上の糖質である請求項15記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項17】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含有する溶液に、請求項1乃至7のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と、当該生成酵素で生成する α -イソマルトシルグルコ糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断しこの α -イソマルトシル部分を転移する α -イソマルトシル転移酵素とを作用させて得られるサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖とともに他の糖質を含有する溶液とし、これを強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにかけ、得られるサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項18】 環状四糖、またはこれを含む糖質が、サイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシルー(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖を、固形物当り30w/w%以上含有していること

を特徴とする請求項15乃至17のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項19】 サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質が、シラップ、マスキット、非晶質粉末、非晶質固状物、結晶粉末、または結晶固状物の形態にあることを特徴とする請求項15乃至18のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項20】 結晶が、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖5乃至6含水結晶、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖1含水結晶、およびサイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖無水結晶から選ばれる1種または2種以上の形態にあることを特徴とする請求項19記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項21】 結晶が、有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたものであることを特徴とする請求項19または20記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項22】 環状四糖を含む糖質が、サイクロ{ $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow)の構造を有する環状四糖とともに、グルコース、マルトース、および非還元性末端の結合様式として α -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から選ばれる1種または2種以上の糖質を含む糖質である請求項15乃至21のいずれ

か記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項 2 3】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質を含有せしめた栄養培地に、請求項 1 乃至 7 のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能と、当該生成酵素で生成する α -イソマルトシルグルコ糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断しこの α -イソマルトシル部分を転移する α -イソマルトシル転移酵素産生能とを有する微生物を培養し、得られるサイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項 2 4】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 2 以上の糖質が、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる 1 種または 2 種以上の糖質である請求項 2 3 記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項 2 5】 微生物が、バチルス属の微生物である請求項 2 4 または 2 5 記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項 2 6】 バチルス属に属する微生物が、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9 (FERM BP-7143)、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11 (FERM BP-7144)、またはそれらの変異株である請求項 2 5 記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項 2 7】 培養物またはこれから得られる糖質に、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼから選ばれる 1 種または 2 種以上の酵素を作用させた後、脱色、脱塩、カラムクロマトグラフィーによる分画、膜による分離、微生物による醗酵処理およびアルカリ処理による分解除去方法から選ばれる 1 種または 2 種以上の精製方法を用いて得られる請求項 2 3 乃至 2 6 のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質。

【請求項 2 8】 澱粉を糊化および／または液化した溶液に、請求項 1 乃至

7のいずれかに記載の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と、当該生成酵素で生成する α -イソマルトシルグルコ糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断しこの α -イソマルトシル部分を転移する α -イソマルトシル転移酵素とを作用させることを特徴とするサイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項29】 澱粉を糊化および／または液化した溶液が、DE20以下の溶液である請求項28記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項30】 澱粉を糊化および／または液化した溶液に、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および α -イソマルトシル転移酵素とともにシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させ、必要に応じて、更に α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよび α -グルコシダーゼから選ばれる1種または2種以上の酵素を作用させることを特徴とする請求項28または29記載のサイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項31】 更に、脱色、脱塩、カラムクロマトグラフィーによる分画、膜による分離、微生物による醗酵処理およびアルカリ処理による分解除去から選ばれる1種または2種以上の精製方法を用いることを特徴とする請求項28乃至30のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項32】 サイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖を、固形物当り30w/w%以上含有している請求項28乃至31のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項33】 サイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

→3) -α-D-グルコピラノシルー(1→)の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質が、シラップ、マスキット、非晶質粉末、非晶質固状物、結晶粉末、または結晶固状物の形態にある請求項28乃至32のいずれかに記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項34】 結晶が、有機溶媒を用いることなく水溶液から晶出させたものである請求項33記載の環状四糖、またはこれを含む糖質の製造方法。

【請求項35】 請求項15乃至27のいずれかに記載のサイクロ{→6)-α-D-グルコピラノシルー(1→3)-α-D-グルコピラノシルー(1→6)-α-D-グルコピラノシルー(1→3)-α-D-グルコピラノシルー(1→)}の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質を含有せしめた組成物。

【請求項36】 サイクロ{→6)-α-D-グルコピラノシルー(1→3)-α-D-グルコピラノシルー(1→6)-α-D-グルコピラノシルー(1→3)-α-D-グルコピラノシルー(1→)}の構造を有する環状四糖、またはこれを含む糖質を、甘味性、難醗酵性、低う蝕性、低カロリー性、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、離水防止性、固結防止性、包接性、保香性、安定性、他の糖の晶出防止性、澱粉老化防止性、蛋白質変性防止性、脂質劣化防止性、耐酸性、耐熱性、若しくはアミノカルボニル反応を起こしにくい特性を有する糖質として、または、甘味料、低う蝕性食品素材、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、保香剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、若しくは粉末化基材として含有させた請求項35記載の組成物。

【請求項37】 組成物が、飲食物、化粧品または医薬品である請求項35または36記載の組成物。

【請求項38】 サイクロ{→6)-α-D-グルコピラノシルー(1→3)-α-D-グルコピラノシルー(1→6)-α-D-グルコピラノシルー(1→3)-α-D-グルコピラノシルー(1→)}の構造を有する環状四糖を固形物当り0.1w/w%以上含有せしめた請求項35乃至37のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途に関し、詳細には、新規な α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とこの酵素を製造する方法、当該酵素を用いた α -グルコシル転移方法、 α -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、加えて、当該酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを併用したサイクロ $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-グルコピラノシル- $(1\rightarrow 3)$ - α -D-グルコピラノシル- $(1\rightarrow 6)$ - α -D-グルコピラノシル- $(1\rightarrow 3)$ - α -D-グルコピラノシル- $(1\rightarrow)$ の構造を有する環状四糖の製造方法、並びにこれらの糖質を含有せしめた組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

グルコースを構成糖とする糖質、例えば、澱粉を原料として製造される澱粉部分分解物としては、アミロース、アミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖、イソマルトオリゴ糖などが知られている。これらの糖質は、通常、分子の両端が、それぞれ非還元性末端と還元性末端とからなり、還元性を示すことが知られている。一般に、澱粉部分分解物は、固形物当りの還元力の大きさをデキストロース・エクイバレント (Dextrose Equivalent = DE) として表わしている。この値の大きいものは、通常、分子が小さく低粘度で、甘味が強いものの、反応性が強く、アミノ酸や蛋白質などのアミノ基を持つ物質とアミノカルボニル反応を起し易く、褐変し悪臭を発生して、品質を劣化し易い性質を有することが知られている。斯かる欠点を改善するために、澱粉部分分解物の構成糖であるグルコースを変えることなく、その還元力を低減、若しくは消滅させる方法が古くから望まれていた。例えば、『ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティー (Journal of American Chemical Society)』、第71巻、353乃至358頁 (1949年) に開示されているように、澱粉にマセランス アミラーゼ (macerals amylase) を作用させることにより、6乃至8分子のグルコースが α -1, 4グルコシル結合した α -、 β -または γ -環状デキストリンを

生成させる方法が知られている。現在では、澱粉からこれら環状デキストリンが工業的規模で生産され、これら環状デキストリンは、それらが有する、非還元性で、無味であり、包接能などの特性を生かした用途に利用されている。また、先に、本出願人が、特開平7-143876号公報、および特開平7-213283号公報などで開示したように、マルトオリゴ糖など澱粉部分分解物に非還元性糖質生成酵素およびトレハロース遊離酵素を作用させることにより、2分子のグルコースが α 、 α -結合したトレハロースを生成させる方法も知られている。現在では、澱粉からトレハロースが工業的規模で生産され、その非還元性で、温和で高品質な甘味特性などを生かした用途に利用されている。このように、グルコースを構成糖とする非還元性糖質として、グルコース重合度が2の α 、 α -トレハロース、グルコース重合度が6乃至8の α -、 β -、 γ -環状デキストリンは、それぞれの特性を生かして工業的規模で生産、利用されているものの、その種類が限られており、更に多様な非還元性糖質乃至低還元性糖質の提供が望まれている。

【0003】

一方、近年、グルコースを構成糖とする新たな環状の四糖類が報告された。即ち、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry)』、第226巻、641乃至648 (1994年) には、主として、グルコース残基が α -1, 3結合と α -1, 6結合とが交互に連なっているアルテルナン (alternan) に加水分解酵素アルテルナナーゼ (alternanase) を作用させることによりサイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖 (本明細書では特にことわらない限り、本糖質を「環状四糖」と略称することもある。) が生成し、これを有機溶媒の一種メタノール共存下で晶出させることが示されている。

【0004】

環状四糖は、環状構造を有し、非還元性の糖質ゆえに、包接能を示し、揮発性有機物を安定化する作用やアミノカルボニル反応を起こさず、褐変、劣化を懸念

することなく利用、加工できることが期待される。

【0005】

しかしながら、環状四糖の製造に必要な原料のアルテルナンや酵素のアルテルナーゼの入手が困難である上、それらを産生する微生物も入手できる状態にはない。

【0006】

斯かる状況下、本発明者等は、先に特願2000-149484号明細書および特願2000-229557号明細書で開示したように、非還元性末端の結合様式として、 $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元性末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質（本明細書においては、本糖質を「 α -イソマルトシルグルコ糖質」と略称することもある。）を原料とし、これに、当該糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断し、この α -イソマルトシル部分を転移して環状四糖を生成する α -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生産することに成功した。この α -イソマルトシル転移酵素は、 α -イソマルトグルコ糖質から α -イソマルトシル転移することによって環状四糖を生成する酵素であって、詳細には、下記の理化学的性質を有する α -イソマルトシル転移酵素である。

【0007】

(1) 作用

非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元性末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質から、 α -イソマルトシル転移することによって、サイクロ {
 $\rightarrow 6$) - α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシルー
 (1 \rightarrow 6) - α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシルー (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖を生成する

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約82,000乃至132,000ダルトン

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、 pI 約5.0乃至6.1

(4) 至適温度

pH 6.0、30分間反応で、約45乃至50℃

(5) 至適 pH

35℃、30分間反応で、 pH 約5.5乃至6.0

(6) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持で、約40℃まで安定

(7) pH 安定性

4℃、24時間保持で、 pH 約4.0乃至9.0

【0008】

しかしながら、環状四糖の原料糖質についてみると、豊富で安価に供給される澱粉からの生産が望まれるものの、実際には、 α -イソマルトシル転移酵素が澱粉に直接作用しないことから、予め、澱粉を前述の特定構造を有する α -イソマルトシルグルコ糖質、例えば、パノースやイソマルトシルマルトースなどの比較的 low molecular weight のイソマルトオリゴ糖に変換させ、次いで、これに α -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させる手法が採用されている。

【0009】

一方、原料からの環状四糖の生成率についてみると、パノースを用いる場合、原料パノース重量当たり約44%である。同様に、イソマルトシルマルトースを用いる場合、約31%であるのに対して、澱粉を用いる場合には、予め、 α -アミラーゼ、澱粉枝切り酵素、 β -アミラーゼおよび α -グルコシダーゼなどを作用させてパノースなどの比較的 low molecular weight のイソマルトオリゴ糖を生成させる必要があるだけでなく、環状四糖の生成率も約15%と極めて低いことが判明している。

【0010】

澱粉からの環状四糖の生産は、この低い生成率でも実用可能であるものの、コスト高が懸念される。斯かる状況下、澱粉などの入手容易な原料から環状四糖の生成率の高い新規な環状四糖の製造方法の確立が望まれる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本願発明は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法、当該酵素を用いて得られる環状四糖またはこれを含む糖質、およびそれらの用途を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するために、澱粉を原料とし、澱粉からの環状四糖を高収率で得るために使用することできる新規な酵素に期待を込めて、斯かる酵素産生能を有する微生物を広く検索してきた。その結果、意外にも、先に特願2000-149484号および特願2000-229557号明細書で開示した、土壌から分離したバチルス (*Bacillus*) 属に属する微生物であって、 α -イソマルトシル転移酵素産生能を有するバチルス グロビスポルス C9株およびC11株が、本発明者等が目指していた新規な α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能をも併せ持つことを見出した。澱粉部分分解物をはじめとする比較的高分子のグルコ糖質に、この新規な α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを作用させることにより、本発明者等が目指していた環状四糖の生成率を著しく向上させることができる事実を新規に見出し、また、当該 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の諸性質を明らかにすると共に、その製造方法を確立し、更には、当該酵素による α -グルコシル転移反応方法、 α -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、および当該酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを併用した環状四糖、またはこれを含む糖質およびその製造方法を確立して本発明を完成した。併せて、このようにして得られる環状四糖、または、これを含む糖質を含有せしめた飲食物、化粧品、医薬品などの組成物を確立して、本発明を完成した。

【0013】

下記に示すのは、本発明の新規な α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能を有するバチルス属に属する微生物C9株の同定試験結果をである。なお、同定試験は、『微生物の分類と同定』（長谷川武治編、学会出版センター、1985年）に準じて行った。

【0014】

【A 細胞形態】

肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至1.0×1.5乃至5μmの桿菌。多形性なし。運動性あり。球形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形成。グラム陽性。

【B 培養性質】

(1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形 大きさは2日間で1乃至2mm。

周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

(2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育：中程度

形状：放散状

(3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

【C 生理学的性質】

(1) VP試験：陰性

(2) インドールの生成：陰性

(3) 硝酸からのガス生成：陽性

(4) 澱粉の加水分解：陽性

(5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない

(6) ウレアーゼ：陽性

(7) オキシダーゼ：陽性

(8) カタラーゼ：陽性

(9) 生育の範囲：pH 5.5乃至9.0

温度 10乃至35℃

(10) 酸素に対する態度：好気性

(11) 炭素源の利用性と酸生成の有無

	利用性	酸生成
D-グルコース	利用する	陽性
グリセロール	利用する	陽性
スクロース	利用する	陽性
ラクトース	利用する	陽性

(12) DNAのGC含量：40%

【0015】

以上の菌学的性質に基づいて、『バーギーズ・マニュアル・オブ・システマティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻(1986年)を参考にし、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、澱粉部分分解物から α -イソマルトシルグルコ糖質を生成する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、および該糖質から α -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する α -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0016】

これらの結果より本発明者等は、本菌をバチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C9と命名し、平成12年4月25日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、受託番号FERM B P-7143として受託された。

【0017】

次に本発明のバチルス属に属する微生物C11の同定試験結果を示す。

【0018】

【A 細胞形態】

肉汁寒天培養、27℃

通常0.5乃至1.0×1.5乃至5 μ mの桿菌。多形性なし。運動性あり。球

形の胞子を細胞内の端に形成。膨潤した胞子嚢を形成。グラム陽性。

【B 培養性質】

- (1) 肉汁寒天平板培養、27℃

形状：円形 大きさは2日間で1乃至2mm。

周縁：全縁

隆起：半レンズ状

光沢：鈍光

表面：平滑

色調：不透明、淡い黄色

- (2) 肉汁寒天斜面培養、27℃

生育：中程度

形状：放散状

- (3) 肉汁ゼラチン穿刺培養、27℃

液化する。

【C 生理学的性質】

- (1) VP試験：陰性

- (2) インドールの生成：陰性

- (3) 硝酸からのガス生成：陽性

- (4) 澱粉の加水分解：陽性

- (5) 色素の生成：可溶性色素の生成はない

- (6) ウレアーゼ：陽性

- (7) オキシダーゼ：陽性

- (8) カタラーゼ：陽性

- (9) 生育の範囲：pH 5.5乃至9.0

温度 10乃至35℃

- (10) 酸素に対する態度：好気性

- (11) 炭素源の利用性と酸生成の有無

	利用性	酸生成
D-グルコース	利用する	陽性

グリセロール	利用する	陽性
スクロース	利用する	陽性
ラクトース	利用する	陽性

(14) DNAのGC含量 : 39%

【0019】

以上の菌学的性質に基づいて、『バージェズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)』、第2巻(1986年)を参考にして、公知菌との異同を検討した。その結果、本菌は、バチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) に属する微生物であることが判明した。また、本菌は、澱粉部分分解物から α -イソマルトシルグルコ糖質を生成する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、および該糖質から α -イソマルトシル基を転移して環状四糖を生成する α -イソマルトシル転移酵素を産生する文献未記載の特徴を有している。

【0020】

これらの結果より本発明者等は、本菌をバチルス グロビスポルス (*Bacillus globisporus*) C11と命名し、平成12年4月25日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、受託番号FERMBP-7144として受託された。

【0021】

本発明に於いては、上記菌株のみに限定されることなく、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能を有する微生物である限り、バチルス属およびそれ以外の属に属する微生物はもとより、それら微生物の変異株も適宜用いることができる。尚、上記菌株以外の他の微生物をスクリーニングする方法は、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の理化学的性質を指標として、公知の微生物スクリーニング方法を用いることにより、容易にスクリーニングすることができる。

【0022】

本発明で用いる微生物の培養に用いる培地は、当該微生物が生育でき、 α -イ

ソマルトシルグルコ糖質生成酵素を産生し得る栄養培地であればよく、合成培地および天然培地のいずれでもよい。炭素源としては、当該微生物が生育に利用できるものであればよく、例えば、植物由来の澱粉やフィトグリコーゲン、動物や微生物由来のグリコーゲンやプルラン、また、これらの部分分解物やグルコース、フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、糖蜜などの糖質、また、クエン酸、コハク酸などの有機酸も使用することができる。培地におけるこれらの炭素源の濃度は炭素源の種類により適宜選択される。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および、例えば、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素含有物が用いられる。また、無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などが適宜用いられる。更に、必要に応じて、アミノ酸、ビタミンなども適宜用いられる。

【0023】

培養は、通常、温度4乃至40℃、好ましくは20乃至37℃、pH4乃至10、好ましくは5乃至9から選ばれる条件で好氣的に行われる。培養時間は微生物が増殖し始める時間以上であればよく、好ましくは10時間乃至150時間である。また、培養液の溶存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5乃至20ppmが好ましい。そのために、通気量を調節したり、攪拌したり、通気し酸素を追加したり、また、フアーメンター内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、回分培養または連続培養のいずれでもよい。

【0024】

このようにして微生物を培養した後、本発明の酵素を回収する。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、菌体を含め培養物全体に認められ、除菌液を粗酵素液として採取することも、培養物全体を粗酵素液として用いることもできる。培養物から菌体を除去するには公知の固液分離法が採用される。例えば、培養物そのものを遠心分離する方法、あるいは、プレコートフィルターなどを用いて濾過分離する方法、平膜、中空糸膜などの膜濾過により分離する方法などが適宜採用される。これら除菌液をそのまま粗酵素液として用いることもできるが、

一般的には、濃縮して用いられる。濃縮法としては、硫酸塩析法、アセトンおよびアルコール沈殿法、減圧濃縮、平膜、中空膜などによる膜濃縮法などの公知の方法を採用し得る。

【0025】

このようにして得られる、本発明の酵素を含む除菌液およびその濃縮液はそのまま、またはそれらの溶液中に含まれる当該酵素を公知の方法により固定化して用いることもできる。この際、例えば、イオン交換体への結合法、樹脂および膜などとの共有結合法・吸着法、高分子物質を用いた包括法などを適宜採用できる。

【0026】

前記酵素液中には、通常、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とが共存している。必要に応じて、公知の方法によって、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を分離・精製して、利用することもできる。一例として、培養液の処理物を硫酸塩析して濃縮した粗酵素標品を透析後、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』樹脂を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー、続いて、『セファクリル (Sephacry) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー、『ブチルトヨパール (Butyl-Toyopearl) 650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー、さらに再度、『セファクリル (Sephacry) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製することにより、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を電気泳動的に単一な酵素として得ることができる。

【0027】

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の理化学的性質の詳細は後述するが、その特徴点としては、非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として α -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成し、デ

キストラン生成能を有さず、EDTAによって活性が阻害され、 Ca^{2+} および Mg^{2+} でその活性が安定化および／または賦活化する性質を有する酵素であつて、詳細には、下記の理化学的性質を有する。尚、前記非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質とは、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉およびグリコーゲンから選ばれる1種または2種以上の糖質を例示できる。

【0028】

(1) 作用

非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する

(2) 分子量

SDS-ゲル電気泳動法により、約117,000乃至160,000ダルトン

(3) 等電点

アンフォライン含有電気泳動法により、 pI 約4.7乃至5.7

(4) 至適温度

pH 6.0、60分間反応で、約40乃至45℃

1mM Ca^{2+} 存在下では、約45乃至50℃

(5) 至適 pH

35℃、60分間反応で、 pH 約6.0乃至6.5

(6) 温度安定性

pH 6.0、60分間保持で、約35乃至40℃まで安定

1mM Ca^{2+} 存在下では、約40乃至45℃まで安定

(7) pH 安定性

4℃、24時間保持で、 pH 約4.5乃至10.0

(8) N末端アミノ酸配列

チロシン-バリン-セリン-セリン-ロイシン-グリシン-アスパラギン-ロイシン-イソロイシン

【0029】

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の基質としては、澱粉、アミロペクチン、アミロース、グリコーゲンなどの α -1, 4グルコシル結合を含む多糖や、それらをアミラーゼまたは酸などによって部分的に加水分解して得られるアミロデキストリン、マルトデキストリン、マルトオリゴ糖などの部分分解物が用いられる。これら α -1, 4結合を含むグルコ糖質を、更にブランチングエンザイムなどの枝付け酵素 (EC 2. 4. 1. 18) で処理した糖質を用いることも随意である。アミラーゼで分解した部分分解物としては、例えば、『ハンドブック・オブ・アミレーシズ・アンド・リレイテッド・エンザイムズ (Handbook of Amylases and Related Enzymes)』、パーガモン・プレス社 (東京) (1988年) に記載されている、 α -アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 1)、 β -アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 2)、マルトトリオース生成アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 116)、マルトテトラオース生成アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 60)、マルトペンタオース生成アミラーゼ、マルトヘキサオース生成アミラーゼ (EC 3. 2. 1. 98) などのアミラーゼで分解した部分分解物を用いることができる。更には、部分分解物を調製する際、プルラナーゼ (3. 2. 1. 41)、イソアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 68) などの澱粉枝切り酵素を作用させることも随意である。

【0030】

基質としての澱粉は、とうもろこし、小麦、米などの穀類に由来する地上澱粉であっても、また馬鈴薯、さつまいも、タピオカなどの地下澱粉であってもよく、好ましくは、澱粉を糊化および/または液化した溶液として用いられる。その澱粉の部分分解の程度は低い程、環状四糖の生成率が高くなることから、DE約20以下、望ましくは約12以下、更に望ましくは約5以下が好適である。

【0031】

本酵素の転移受容体としては、上記の基質自体が受容体となり得るばかりでな

く、グルコース、キシロース、ガラクトース、フラクトース、アラビノース、フコース、ソルボース、およびN-アセチルグルコサミンなどの単糖類、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、ラクトース、およびスクロースなどのオリゴ糖類などを用いることができる。

【0032】

基質濃度は特に限定されない。例えば、基質濃度0.1%（以下、本明細書では、特に断らない限り、「w/w%」を単に「%」と略称する）の低濃度溶液として用いた場合でも、本発明の酵素反応は進行するが、工業的には、1%以上が好適である。また、基質溶液中に、完全に溶けきらない不溶性基質を含有するものであってもよい。望ましくは、濃度40%以下、更に望ましくは20%以下が好適である。

【0033】

反応温度は反応が進行する温度、すなわち50℃付近までで行なえばよい。好ましくは30乃至45℃付近の温度を用いる。反応pHは、通常、4.5乃至8の範囲に調整すればよい。好ましくはpH約5.5乃至7の範囲に調整する。反応時間は酵素反応の進行により適宜選択する。

【0034】

本酵素の反応によって生成した α -イソマルトシルグルコ糖質に対して、 α -イソマルトシル転移酵素を作用させることにより著量の環状四糖を製造することができる。 α -イソマルトシル転移酵素の作用は、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させ、本酵素を失活させた後に行なってもよい。好ましくは、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを同時併用して作用させる。例えば、澱粉またはその部分分解物やグリコーゲンの水溶液に本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを共存させ同時併用して作用させることにより、澱粉またはその部分分解物からは環状四糖が固形物当たり約30%以上の高い生成率で、グリコーゲンの場合は約80%以上もの高い生成率で環状四糖が得られる。この α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との同時併用における環状四糖の生成メカニズムは、両酵素の反応特性から以下のように推察さ

れる。

【0035】

(1) 本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、非還元性末端の結合様式として α -1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質、例えば、澱粉、グリコーゲン、またはこれらの部分分解物などの糖質の非還元末端の α -1, 4 グルコシル基に作用し、グルコース基を他の非還元末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に α -イソマルトシル基を有する糖質が生成する。

(2) α -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する糖質に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端に位置するイソマルトシル基を有する糖質の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する糖質を生成する。

(3) 続いて、 α -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する糖質に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を糖質から切り離し、これを環状化して環状四糖を生成する。

(4) 切り離された糖質は、再度、(1) から (3) の反応を経由することによって、環状四糖を生成し、更にそれらの反応が繰返されて著量の環状四糖を蓄積する。

【0036】

以上、説明したように、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との同時併用で、上記のように両酵素がそれらの基質に繰り返して作用し、環状四糖の生成率が著しく向上するものと推察される。

【0037】

また、この環状四糖生成反応の際、他の転移酵素を更に同時併用して、環状四糖の生成率を向上させることも有利に実施できる。即ち、例えば、濃度約15%の澱粉部分分解物に、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素の二者を同時併用して作用させることにより、約55%の生成率で

環状四糖が得られるところ、同じ条件で α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼの三者を同時併用して作用させることにより、環状四糖の最高生成率を、さらに約5乃至10%高めて約60乃至65%に向上させることができる。

【0038】

また、環状四糖を生成させるに際し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素産生能と、当該生成酵素で生成する α -イソマルトシルグルコ糖質の α -イソマルトシル部分とそれ以外のグルコ糖質部分とを特異的に切断しこの α -イソマルトシル部分を転移する α -イソマルトシル転移酵素産生能とを有する微生物を用いる培養方法により環状四糖を製造方法することもできる。

【0039】

斯かる微生物を用いる環状四糖を生成する方法において用いる培養培地は、非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質を含み、かつ当該微生物が生育し得る合成培地又は天然培地のいずれをも用いることができる。その他の培養条件は、前記した本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を産生させる条件を採用することができる。

【0040】

上記の反応または培養によって得られた溶液は、環状四糖、またはこれを含む糖質を含む溶液としてこのまま用いることもできる。一般的には、これら糖質は精製して用いられる。精製方法としては、公知の方法を適宜採用すればよく、例えば、活性炭での脱色、H型、OH型イオン交換樹脂での脱塩、イオン交換カラムクロマトグラフィー、活性炭カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィーによる分画、アルコールおよびアセトンなど有機溶媒による分別、適度な分離性能を有する膜による分離、更には、アミラーゼ、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼ (EC 3. 2. 1. 3) などや α -グルコシダーゼ (EC 3. 2. 1. 20) などの酵素で残存している他の糖質の分解、酵母での発酵処理、アルカリ処理などによる残存している還元性糖質の分解除去などの精製方法を1種または2種以上組み合わせて精製することができる。

【0041】

とりわけ、工業的大量生産方法としては、イオン交換カラムクロマトグラフィーが好適であり、例えば、特開昭58-23799号公報、特開昭58-72598号公報などに開示されている強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーにより夾雑糖類を除去することにより、目的物の含量を向上させた環状四糖、またはこれを含む糖質を有利に製造することができる。この際、固定床方式、移動床方式、疑似移動床方式のいずれの方式を採用することも随意である。

【0042】

このようにして得られた環状四糖、またはこれを含む糖質を濃縮し、シラップ状製品とする。更に、乾燥して粉末状製品にすることも随意である。

【0043】

環状四糖結晶を製造するには、例えば、有機溶媒存在下又は純度約50%以上、濃度約30%乃至90%の環状四糖高含有液を助晶缶にとり、環状四糖固形物当たり0.1乃至20%の種結晶共存下で、温度95℃以下、望ましくは10乃至90℃の範囲で、攪拌しつつ徐冷し、環状四糖結晶を含有するマスキットを製造する。マスキットから環状四糖結晶またはこれを含む含蜜結晶を製造する方法は、例えば、分蜜方法、ブロック粉碎方法、流動造粒方法、噴霧乾燥方法など公知の方法を採用すればよい。

【0044】

このようにして製造される本発明の環状四糖は、上品で低甘味を有する非還元性の白色粉末で、安定な糖質であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有する物質と混合、加工しても、褐変することも、異臭を発生することもなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。

【0045】

また、本発明の環状四糖は、包接能を有していることから、香氣成分、有効成分などの揮散、品質劣化を防止し、香氣成分、有効成分の安定化保持に極めて優れている。この際、必要ならば、シクロ（環状）デキストリン類、分岐シクロデキストリン類、シクロデキストラン類、シクロフラクタン類など他の環状糖質を

併用することで、包接能による安定化を強化することも有利に実施できる。シクロデキストリン類などの環状糖質としては、高純度のものに限る必要はなく、低純度の環状糖質、例えば、多量のマルトデキストリンとともに各種のシクロデキストリンを含有した澱粉部分分解物なども有利に利用できる。

【0046】

更に、本発明の環状四糖は、アミラーゼや α -グルコシダーゼによって分解されないことから、経口摂取しても消化吸収されず、また、腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低カロリーの水溶性食物繊維として利用することができる。虫歯誘発菌などによっても、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用できる。粉末状物の付着、固結を防止することもできる。更に、本発明の環状四糖自体は、無毒、無害の天然甘味料であり、何らの危険性もなく、安定な甘味料であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤と糖衣錠として利用することも有利に実施できる。また、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の結晶防止性、難醗酵性などの性質を具備している。

【0047】

従って、本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質は、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。

【0048】

本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質は、そのまま甘味付のための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、異性化糖、砂糖、麦芽糖、トレハロース、蜂蜜、メープルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチルリチン、ソーマチン、L-アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スクラロース、グリシン、アラニンなどの他の甘味料と併用することも、又、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と併用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー甘味料や α -グリコシルステビオシド、ソーマチン

、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK及びスクラロースなどの1種又は2種以上の高甘味度甘味料と併用して、低カロリー甘味料又はダイエット甘味料などとして好適に利用することができる。

【0049】

また、本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質は、そのまま、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して使用することも随意である。

【0050】

更に、本発明の環状四糖、またはこれを含む糖質の甘味は、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの他の呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料への甘味料、更には、呈味改良剤、品質改良剤などとして使用することも有利に実施できる。また、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろ、あん類、羊羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウに、イカの塩辛、酢コンブ、さきする

め、ふぐのみりん干し、たら、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビールなどの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、品質改良などに有利に実施できる。また、家畜、家禽、その他は蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料など嗜好性を向上させる目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種の固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への甘味剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらに品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性など失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン α 、 β 、 γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター α 、 β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーファクター、インターロイキンIIなどのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCGワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、EPA、DHA、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸またはそのエステル誘導体、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなど

のエキス類またはローヤルゼリーなどの各種生理活性物質、更には、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペーストなどの有効成分や活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状または固状の健康食品や医薬品などを容易に製造できることとなる。

【0051】

以上述べたような各種組成物に、環状四糖、またはこれを含む糖質を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その量は、通常0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

【0052】

以下、本発明を実験を用いて詳細に説明する。

【0053】

【実験1】

＜培養物からの非還元性環状糖質の調製＞

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#1』、松谷化学株式会社製造）5 w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5 w/v%、リン酸二カリウム0.1 w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06 w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05 w/v%、および水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに100 mlを入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C9（FERM BP-7143）を接種し、27℃、230 rpmで48時間回転振盪培養した後、遠心分離して菌体を除き培養上清を得た。さらに、その培養上清をオートクレーブ（120℃、15分間）し、放冷した後、不溶物を遠心分離して除き上清を回収した。

【0054】

得られた上清中の糖質を調べるため、展開溶媒としてn-ブタノール、ピリジン、水混液（容量比6:4:1）、薄層プレートとしてメルク社製『キーゼルゲル60』（アルミプレート、20×20 cm）を用い2回展開するシリカゲル薄

層クロマトグラフィー（以下、「TLC」と略す。）を行ない、上清中の糖質を分離した。検出法として、分離した全糖質を硫酸-メタノール法で発色し、また、還元糖質をジフェニルアミン-アニリン法で発色して調べたところ、 R_f 値が約 0.31 の位置に硫酸-メタノール法で陽性、かつ、ジフェニルアミン-アニリン法で陰性の非還元性糖質が検出された。

【0055】

先に得た上清約 90 ml を pH 5.0、温度 45℃ に調整した後、 α -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物 1 グラム当り 1,500 単位とグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物 1 グラム当り 75 単位添加して 24 時間処理し、続いて、水酸化ナトリウムで pH を 12 に調整し 2 時間煮沸して、残存する還元糖を分解した。不溶物を濾過して除去した後、三菱化学製イオン交換樹脂『ダイヤイオン PK218』と『ダイヤイオン WA30』を用いて脱色、脱塩し、さらに、三菱化学製カチオン交換樹脂『ダイヤイオン SK-1B』とオルガノ製アニオン交換樹脂『IRA411』で再度脱塩し、活性炭で脱色し、精密濾過した後、エバポレータで濃縮し凍結真空乾燥して固形物として約 0.6 g の糖質粉末を得た。

【0056】

得られた糖質の組成を高速液体クロマトグラフィー法（以下、HPLC と略称する。）で調べたところ、図 1 に示すように、溶出時間 10.84 分に単一ピークのみが検出され、純度は 99.9% 以上で極めて高純度であることが判明した。なお、HPLC は、『ショウデックス (Shodex) KS-801 カラム』（昭和電工株式会社製造）を用いカラム温度 60℃、流速 0.5 ml/min 水の条件で行い、検出は示唆屈折計『RI-8012』（東ソー株式会社製造）を用いて行なった。

【0057】

また、還元力をソモギー・ネルソン法で測定したところ、その還元力は検出限界以下であり、本標品は実質的に非還元性糖質であると判断される。

【0058】

【実験2】

＜非還元性糖質の構造解析＞

実験1の方法で得られた非還元性糖質について、高速原子衝撃法による質量分析（通称「FAB-MS」）したところ、質量数649のプロトン付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数が648であることが判明した。

【0059】

また、常法に従って、硫酸を用い加水分解し、ガスクロマトグラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、本糖質の構成糖はD-グルコースであることも判明し、質量数を考慮すると、本糖質はD-グルコース4分子からなる環状糖質であることがわかった。

【0060】

さらに、本糖質を用いて核磁気共鳴法（通称NMR）を行ったところ、図2に示す ^1H -NMRスペクトルと、図3に示す ^{13}C -NMRスペクトルが得られ、これらスペクトルを既知糖質のものと異同を比較したところ、『ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー（European Journal of Biochemistry）』、641乃至648頁（1994年）に記載されている非還元性環状糖質サイクロ（ $\rightarrow 6$ ）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow 3）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow 6）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow 3）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow ）のスペクトルと一致し、本糖質の構造が図4に示す環状四糖、即ち、サイクロ（ $\rightarrow 6$ ）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow 3）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow 6）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow 3）- α -D-グルコピラノシル-（1 \rightarrow ）であることが判明した。

【0061】

【実験3】

＜パチルス グロビスポルス C9からの α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産＞

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#4』、松谷化学株式会社製造）4.0w/v%、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』（アサヒビール株式会社

製造) 1. 8 w/v%, リン酸二カリウム 0. 1 w/v%, リン酸一ナトリウム・12水塩 0. 06 w/v%, 硫酸マグネシウム・7水塩 0. 05 w/v%, および水からなる液体培地を、500 ml 容三角フラスコに 100 ml ずつ入れ、オートクレーブで 121℃、20 分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C9 (FERM BP-7143) を接種し、27℃、230 rpm で 48 時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0062】

容量 30 L のファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約 20 L 入れて、加熱滅菌、冷却して温度 27℃ とした後、種培養液 1 v/v% を接種し、温度 27℃、pH 6. 0 乃至 8. 0 に保ちつつ、48 時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約 0. 45 単位/ml で、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約 1. 5 単位/ml で、環状四糖生成活性は約 0. 95 単位/ml であり、遠心分離 (10, 000 rpm、30 分間) して回収した上清約 18 L の酵素活性を測定したところ、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約 0. 45 単位/ml の活性 (総活性約 8, 110 単位) で、 α -イソマルトシル転移酵素は約 1. 5 単位/ml の活性 (総活性約 26, 900 単位) で、環状四糖生成活性は約 0. 95 単位/ml (総活性約 17, 100 単位) であった。

【0063】

なお、酵素活性は次のようにして測定した。即ち、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定は、マルトトリオースを濃度 2 w/v% となるよう 100 mM 酢酸緩衝液 (pH 6. 0) に溶解させて基質液とし、その基質液 0. 5 ml に酵素液 0. 5 ml 加えて、35℃ で 60 分間酵素反応し、その反応液を 10 分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成するイソマルトシルマルトースとマルトースのうち、このマルトース量を、実験 1 に記載の HPLC 法で定量することによって行った。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の活性 1 単位は、上記の条件下で 1 分間に 1 μ モルのマルトースを生成する酵素量とした。

【0064】

また、 α -イソマルトシル転移酵素活性の測定は、パノースを濃度2w/v%となるよう100mM酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解させ基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃で30分間酵素反応し、その反応液を10分間煮沸して反応を停止させた後、その反応液中に主に生成する環状四糖とグルコースのうち、このグルコース量をグルコースオキシダーゼ法で定量することによって行った。 α -イソマルトシル転移酵素の活性1単位は、上記の条件下で1分間に1 μ モルのグルコースを生成する酵素量とした。

【0065】

環状四糖生成活性の測定は、澱粉部分分解物(商品名『バインデックス#100』、松谷化学株式会社製造)を濃度2w/v%となるよう50mM酢酸緩衝液(pH6.0)に溶解させ基質液とし、その基質液0.5mlに酵素液0.5ml加えて、35℃で60分間酵素反応し、その反応液を100℃で10分間熱処理して反応を停止させた後、更に、 α -グルコシダーゼ(商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬製造)70単位/mlとグルコアミラーゼ(ナガセ生化学工業株式会社販売)2.7単位/mlとを含む50mM酢酸緩衝液(pH5.0)1mlを加えて、50℃で60分間処理し、その液を100℃で10分間熱処理して酵素を失活させた後、環状四糖量を実験1に記載のHPLC法で定量することによって行った。環状四糖生成活性1単位は、上記の条件下で1分間に1 μ モルの環状四糖を生成する酵素量とした。

【0066】

【実験4】

<バチルス グロビスポルス C9由来酵素の調製>

【実験4-1】

<バチルス グロビスポルス C9由来酵素の精製>

実験3で得られた培養上清約18Lを80%飽和硫酸アンモニウムで塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収し10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約400mlを得た。この粗酵素液は、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を8,110単位と、 α -イソマルトシル転移酵素

活性を24,700単位と、環状四糖生成活性を約15,600単位有していた。この粗酵素液を三菱化学株式会社製『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィー (ゲル容量1,000 ml) に供した。この際、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、 α -イソマルトシル転移酵素および環状四糖のいずれも、『セパビーズ (Sepabeads) FP-DA13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.0) に透析し、その透析液を遠心分離して不純物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー (ゲル量500ml) に供した。酵素活性成分は、『セファクリル (Sephacryl) HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース0mMから100mMのリニアグラジエントで溶出させたところ、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とは分離して溶出し、 α -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約0M付近に溶出し、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオースのリニアグラジエントでその濃度が約30mM付近に溶出した。そこで、 α -イソマルトシル転移酵素活性画分と本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性画分とを別々に集め回収した。また、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と α -イソマルトシル転移酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

【0067】

以下、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

【0068】

【実験4-2】

＜ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製＞

実験4-1で得た本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoppearl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表1に示す。

【0069】

【表1】

工 程	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素比活性 (単位/mg蛋白)	収 率 (%)
培養上清	8,110	0.12	100
硫酸塩析後の透析液	7,450	0.56	91.9
イオン交換カラム溶出液	5,850	1.03	72.1
アフィニティークラム溶出液	4,040	8.72	49.8
疎水カラム溶出液	3,070	10.6	37.8
アフィニティークラム溶出液	1,870	13.6	23.1

【0070】

精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0071】

【実験4-3】

< α -イソマルトシル転移酵素の精製>

実験4-1に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した α -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl) 650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl) 650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl) HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表2に示す。

【0072】

【表2】

工 程	α -イソマルト シル転移酵素活 性量(単位)	α -イソマルトシル 転移酵素比活性 (単位/mg蛋白)	収 率 (%)
培養上清	26,900	0.41	100
硫酸塩析後の透析液	24,700	1.85	91.8
イオン交換カラム溶出液	19,400	3.41	72.1
アフィニティークラム溶出液	13,400	18.6	49.8
疎水カラム溶出液	10,000	21.3	37.2
アフィニティークラム溶出液	6,460	26.9	24.0

【0073】

【実験5】

< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および α -イソマルトシル転移酵素の

性質>

【実験5-1】

< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質>

実験4-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約140,000 \pm 20,000ダルトンであった。

【0074】

精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を2w/v%アンフォライン(アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.2 \pm 0.5であった。

【0075】

本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、 Ca^{2+} 非存在下と1mM存在下で測定した。これらの結果を図5(温度の影響)、図6(pHの影響)を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、60分間反応で約40 $^{\circ}\text{C}$ (Ca^{2+} 非存在)、約45 $^{\circ}\text{C}$ (Ca^{2+} 1mM存在)、至適pHは、35 $^{\circ}\text{C}$ 、60分間反応で約6.0乃至6.5であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液(20mM酢酸緩衝液、pH6.0)を Ca^{2+} 非存在下または1mM存在下で各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図7(温度安定性)、図8(pH安定性)に示した。本酵素の温度安定性は約35 $^{\circ}\text{C}$ まで(Ca^{2+} 非存在)、約40 $^{\circ}\text{C}$ まで(Ca^{2+} 1mM存在)で、pH安定性は約4.5乃至9.0であった。

【0076】

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性

測定の方法に準じて調べた。結果を表3に示す。

【0077】

【表3】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg ²⁺	4
Zn ²⁺	92	Ba ²⁺	65
Mg ²⁺	100	Sr ²⁺	80
Ca ²⁺	115	Pb ²⁺	103
Co ²⁺	100	Fe ²⁺	98
Cu ²⁺	15	Fe ³⁺	97
Ni ²⁺	98	Mn ²⁺	111
Al ³⁺	99	EDTA	20

【0078】

表3の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg²⁺、Cu²⁺、EDTAで著しく阻害され、Ba²⁺、Sr²⁺で阻害された。Ca²⁺、Mn²⁺で活性化されることも判明した。

【0079】

本酵素のN末端アミノ酸配列を、プロテインシーケンサー モデル473A（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列チロシンーバリンーセリンーセリンーロイシンーグリシンーアスパラギンーロイシンーイソロイシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

【0080】

【実験5-2】

＜α-イソマルトシル転移酵素の性質＞

実験4-3の方法で得た精製α-イソマルトシル転移酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約112,000±20,000ダルトンであった。

【0081】

精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を2w/v%アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.5 \pm 0.5であった。

【0082】

本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果を図9（温度の影響）、図10（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約45℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図11（温度安定性）、図12（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約40℃までで、pH安定性は約4.0乃至9.0であった。

【0083】

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表4に示す。

【0084】

【表4】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg ²⁺	1
Zn ²⁺	88	Ba ²⁺	102
Mg ²⁺	98	Sr ²⁺	101
Ca ²⁺	101	Pb ²⁺	89
Co ²⁺	103	Fe ²⁺	96
Cu ²⁺	57	Fe ³⁺	105
Ni ²⁺	102	Mn ²⁺	106
Al ³⁺	103	EDTA	104

【0085】

表4の結果から明らかなように、本酵素活性は、 Hg^{2+} で著しく阻害され、 Cu^{2+} で阻害された。また、 Ca^{2+} で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

【0086】

本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号2に示すアミノ酸配列のイソロイシン-アスパラギン酸-グリシン-バリン-チロシン-ヒスチジン-アラニン-プロリン-アスパラギン-グリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

【0087】

【実験6】

＜バチルス グロビスポルス C11からの α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の生産＞

澱粉部分分解物『バインデックス#4』4.0w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.8w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、および水からなる液体培地を、500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌し、冷却して、バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) を接種し、27℃、230rpmで48時間回転振盪培養したものを種培養とした。

【0088】

容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の培地を約20L入れて、加熱滅菌、冷却して温度27℃とした後、種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保ちつつ、48時間通気攪拌培養した。培養後、培養液中の本酵素活性は約0.55単位/mlで、 α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.8単位/mlで、環状四糖生成活性は約1.1単位/mlであり、遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収した上清約18Lの酵素活性を測定したところ、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は約0

51単位/mlの活性(総活性約9,180単位)で、 α -イソマルトシル転移酵素は約1.7単位/mlの活性(総活性約30,400単位)で、環状四糖生成活性は約1.1単位/ml(総活性約19,400単位)であった。

【0089】

【実験7】

<バチルス グロビスポルス C11由来酵素の調製>

【実験7-1】

<バチルス グロビスポルス C11由来酵素の精製>

実験6で得られた培養上清約18Lを80%飽和硫酸液で塩析して4℃、24時間放置した後、その塩析沈殿物を遠心分離(10,000rpm、30分間)して回収し10mMリン酸緩衝液(pH7.5)に溶解後、同緩衝液に対して透析して粗酵素液約416mlを得た。この粗酵素液は、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を8,440単位、 α -イソマルトシル転移酵素活性を約28,000単位、環状四糖生成活性を約17,700単位を有することが判明した。この粗酵素液を、実験4-1に記載の『セパビーズ(Sepabeads)FP-DA13』ゲルを用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性、 α -イソマルトシル転移酵素活性、環状四糖生成いずれも、『セパビーズ(Sepabeads)FP-DA13』ゲルに吸着せずに、非吸着画分に溶出した。この酵素液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、アマシャム・ファルマシア・バイオテック株式会社製『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィー(ゲル量500ml)に供した。酵素活性は、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエント、更に続いて、マルトテトラオース0mMから100mMのリニアグラジエントで溶出させたところ、 α -イソマルトシル転移酵素と本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は分離して溶出し、 α -イソマルトシル転移酵素活性は硫酸のリニアグラジエントでその濃度が約0.3M付近で溶出し、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は、マルトテトラオー

スのリニアグラジエントでその濃度が約30 mM付近で溶出した。そこで、 α -イソマルトシル転移酵素活性画分と本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを別々に集め回収した。実験4に記載のC9株の場合と同様に、環状四糖生成活性は本カラムクロマトグラフィーのいずれの画分にも認められないことがわかり、また、得られた α -イソマルトシル転移酵素画分と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分とを混合した酵素液は環状四糖生成活性を示すこともわかり、澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性は本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との両酵素活性の共同作用によって発揮されることが判明した。

【0090】

以下、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを別々に精製する方法について述べる。

【0091】

【実験7-2】

< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製>

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分を1M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl) 650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350 ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl) 650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl) HR-S-200』ゲルを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性量、比活性、収率を表5に示す。

【0092】

【表5】

工 程	α -イソマルトシルグルコ 糖質生成酵素活性量 (単位)	α -イソマルトシルグルコ 糖質生成酵素比活性 (単位/mg蛋白)	収 率 (%)
培養上清	9,180	0.14	100
硫酸塩析後の透析液	8,440	0.60	91.9
イオン交換カラム溶出液	6,620	1.08	72.1
アフィニティークラム溶出液	4,130	8.83	45.0
疎水カラム溶出液	3,310	11.0	36.1
アフィニティークラム溶出液	2,000	13.4	21.8

【0093】

精製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を7.5w/v%濃度ポリアクリルアミドを含むゲル電気泳動により酵素標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で純度の高い標品であった。

【0094】

【実験7-3】

＜ α -イソマルトシル転移酵素の精製＞

実験7-1に記載のアフィニティークロマトグラフィーによって α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素画分と分離した α -イソマルトシル転移酵素画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、東ソー株式会社製『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl)650M』ゲルを用いた疎水クロマトグラフィー(ゲル量350ml)に供した。本酵素は、『ブチルートヨパール(Butyl-Toyoparl)650M』ゲルに吸着し、硫酸1Mから0Mのリニアグラジエントで溶出させたところ、硫酸濃度約0.3M付近で吸着した酵素が溶出し、本酵素活性を示す画分を集め回収した。再度、この回収液を1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液(pH7.0)に透析し、その透析液を遠心分離して不溶物を除き、『セファクリル(Sephacryl)HR S-200』ゲルを用いたア

フィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。この精製の各ステップにおける α -イソマルトシル転移酵素活性量、比活性、収率を表6に示す。

【0095】

【表6】

工 程	α -イソマルト シル転移酵素活 性量(単位)	α -イソマルトシル 転移酵素比活性 (単位/mg蛋白)	収 率 (%)
培養上清	30,400	0.45	100
硫酸塩析後の透析液	28,000	1.98	92.1
イオン交換カラム溶出液	21,800	3.56	71.7
アフィニティークラム溶出液	13,700	21.9	45.1
疎水カラム溶出液	10,300	23.4	33.9
アフィニティークラム溶出液	5,510	29.6	18.1

【0096】

【実験8】

< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の調製>

【実験8-1】

< α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質>

実験7-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(ゲル濃度7.5w/v%)に供し、同時に泳動した分子量マーカー(日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製)と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約137,000 \pm 20,000ダルトンであった。

【0097】

精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を2w/v%アンフォライン(アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.2 \pm 0.5であった。

【0098】

本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。なお、温度の影響については、 Ca^{2+} 非存在下と1 mM存在下で測定した。これらの結果を図13（温度の影響）、図14（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH 6.0、60分間反応で約45℃（ Ca^{2+} 非存在）、約50℃（ Ca^{2+} 1 mM存在）、至適pHは、35℃、60分間反応で約6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20 mM酢酸緩衝液、pH 6.0）を Ca^{2+} 非存在下または1 mM存在下で各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH 50 mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図15（温度安定性）、図16（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約40℃まで（ Ca^{2+} 非存在）、約45℃まで（ Ca^{2+} 1 mM存在）で、pH安定性は約5.0乃至10.0であった。

【0099】

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1 mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表7に示す。

【0100】

【表7】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg^{2+}	4
Zn^{2+}	91	Ba^{2+}	65
Mg^{2+}	98	Sr^{2+}	83
Ca^{2+}	109	Pb^{2+}	101
Co^{2+}	96	Fe^{2+}	100
Cu^{2+}	23	Fe^{3+}	102
Ni^{2+}	93	Mn^{2+}	142
Al^{3+}	100	EDTA	24

【0101】

表7の結果から明らかなように、本酵素活性は、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、EDTAで著しく阻害され、 Ba^{2+} 、 Sr^{2+} で阻害された。 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} で

活性化されることも判明した。

【0102】

本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列N末端チロシン-バリン-セリン-セリン-ロイシン-グリシン-アスパラギン-ロイシン-イソロイシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。

【0103】

このN末端アミノ酸配列結果を実験5-1のパチルス・グロビシボルスC9由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のN末端配列と比較すると同一であることが判明し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列チロシン-バリン-セリン-セリン-ロイシン-グリシン-アスパラギン-ロイシン-イソロイシンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

【0104】

【実験8-2】

< α -イソマルトシル転移酵素の性質>

実験7-3の方法で得た精製 α -イソマルトシル転移酵素標品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ゲル濃度7.5w/v%）に供し、同時に泳動した分子量マーカー（日本バイオ・ラッド・ラボラトリーズ株式会社製）と比較して本酵素の分子量を測定したところ、分子量約102,000 \pm 20,000ダルトンであった。

【0105】

精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を2w/v%アンフォライン（アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製）含有等電点ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供し、泳動後、蛋白バンドおよびゲルのpHを測定して本酵素の等電点を求めたところ、等電点はpI約5.6 \pm 0.5であった。

【0106】

本酵素活性に及ぼす温度、pHの影響を活性測定の方法に準じて調べた。結果

を図17（温度の影響）、図18（pHの影響）を示した。酵素の至適温度は、pH6.0、30分間反応で約50℃、至適pHは、35℃、30分間反応で約5.5乃至6.0であった。本酵素の温度安定性は、酵素溶液（20mM酢酸緩衝液、pH6.0）を各温度に60分間保持し、水冷した後、残存する酵素活性を測定することにより求めた。また、pH安定性は、本酵素を各pH50mM緩衝液中で4℃、24時間保持した後、pHを6.0に調整し、残存する酵素活性を測定することにより求めた。それぞれの結果を図19（温度安定性）、図20（pH安定性）に示した。本酵素の温度安定性は約40℃までで、pH安定性は約4.0乃至9.0であった。

【0107】

本酵素活性に及ぼす金属イオンの影響を濃度1mMの各種金属塩存在下で活性測定の方法に準じて調べた。結果を表8に示す。

【0108】

【表8】

金属イオン	相対活性 (%)	金属イオン	相対活性 (%)
無添加	100	Hg ²⁺	2
Zn ²⁺	83	Ba ²⁺	90
Mg ²⁺	91	Sr ²⁺	93
Ca ²⁺	91	Pb ²⁺	74
Co ²⁺	89	Fe ²⁺	104
Cu ²⁺	56	Fe ³⁺	88
Ni ²⁺	89	Mn ²⁺	93
Al ³⁺	89	EDTA	98

【0109】

表8の結果から明らかなように、本酵素活性は、Hg²⁺で著しく阻害され、Cu²⁺で阻害された。また、Ca²⁺で活性化されないことも、EDTAで阻害されないこともわかった。

【0110】

本酵素のN末端アミノ酸配列を、『プロテインシーケンサー モデル473A』（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて分析したところ、配列表におけ

る配列番号3に示すアミノ酸配列のイソロイシン-アスパラギン酸-グリシン-バリン-チロシン-ヒスチジン-アラニン-プロリン-チロシン-グリシンのN末端アミノ酸配列を有していることがわかった。このN末端アミノ酸配列結果を実験5-2のパチルス グロビスポルス C9由来の α -イソマルトシル転移酵素のN末端配列と比較して、 α -イソマルトシル転移酵素の共通するN末端アミノ酸配列は、配列表における配列番号4に示すアミノ酸配列のイソロイシン-アスパラギン酸-グリシン-バリン-チロシン-ヒスチジン-アラニン-プロリンのN末端アミノ酸配列であることが判明した。

【0111】

【実験9】

＜ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のアミノ酸配列＞

【実験9-1】

＜ α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の内部部分アミノ酸配列＞

実験7-2の方法で得られた精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品の一部を10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約1 mg/mlの濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に10 μ gのトリプシン (和光純薬株式会社販売) を加え、30℃、22時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行なった。マイクロボンドパックC18カラム (直径2.1 mm×長さ150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速0.9 ml/分、室温で0.1%トリフルオロ酢酸-8%アセトニトリル溶液から0.1%トリフルオロ酢酸-40%アセトニトリル溶液の120分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長210 nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した3ペプチド [P64 (保持時間約64分)、P88 (保持時間約88分)、P99 (保持時間約99分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200 μ lの0.1%トリフルオロ酢酸-50%アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ8残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号5乃至7に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列を表9

に示す。

【0112】

【表9】

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P 6 4	アスパラギン酸-アラニン-セリン-アラニン-アスパラギン-バリン-スレオニン-スレオニン
P 8 8	トリプトファン-セリン-ロイシン-グリシン-フェニルアラニン-メチオニン-アスパラギン-フェニルアラニン
P 9 9	アスパラギン-チロシン-スレオニン-アスパラギン酸-アラニン-トリプトファン-メチオニン-フェニルアラニン

【0113】

【実験9-2】

＜ α -イソマルトシル転移酵素の内部部分アミノ酸配列＞

実験7-3の方法で得られた精製 α -イソマルトシル転移酵素標品の一部を10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に対して、透析した後、同緩衝液で約1 mg/mlの濃度になるように希釈した。この試料液 (1 ml) に10 μ g のリジルエンドペプチダーゼ (和光純薬株式会社販売) を加え、30℃、22時間反応させることによりペプチド化した。生成したペプチドを単離するため、逆相HPLCを行なった。マイクロボンドバックC18カラム (直径2.1 mm×長さ150 mm、ウオーターズ社製) を用い、流速0.9 ml/分、室温で0.1%トリフルオロ酢酸-8%アセトニトリル溶液から0.1%トリフルオロ酢酸-40%アセトニトリル溶液の120分間のリニアグラジエントの条件で行なった。カラムから溶出したペプチドは、波長210 nmの吸光度を測定することにより検出した。他のペプチドとよく分離した3ペプチド [P22 (保持時間約22分)、P63 (保持時間約63分)、P71 (保持時間約71分)] を分取し、それぞれを真空乾燥した後、200 μ l の0.1%トリフルオロ酢酸-50%アセトニトリル溶液に溶解した。それらペプチド試料をプロテインシーケンサーに供し、それぞれ8残基までアミノ酸配列を分析したところ、配列表における配列番号8乃至10に示すアミノ酸配列が得られた。得られた内部部分アミノ酸配列

を表10に示す。

【0114】

【表10】

ペプチド名	内 部 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列
P22	グリシン-アスパラギン-グルタミン酸-メチオニン-アルギニン-アスパラギン-グルタミン-チロシン
P63	イソロイシン-スレオニン-スレオニン-トリプトファン-プロリン-イソロイシン-グルタミン酸-セリン
P71	トリプトファン-アラニン-フェニルアラニン-グリシン-ロイシン-トリプトファン-メチオニン-セリン

【0115】

【実験10】

<各種糖質への作用>

各種糖質を用いて、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の基質になりうるかどうかの試験をした。マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘプタオース、イソマルトース、イソマルトトリオース、パノース、イソパノース、トレハロース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、マルトトリイトール、ラクトース、スクロース、エルロース、セラギノース、マルトシルグルコシド、イソマルトシルグルコシドを含む溶液を調製した。

【0116】

これらの溶液に、実験4-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C9由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品、または実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を基質固形物1グラム当たりそれぞれ2単位ずつ加え、基質濃度を2w/v%になるように調整し、これを30℃、pH6.0で24時間作用させた。酵素反応前後の反応液を、実験1記載のTLC法で分析し、それぞれの糖質に対する酵素作用の有無を確認した。結果を表11に示す。

【0117】

【表 11】

基 質	酵素作用		基 質	酵素作用	
	C9 酵素	C11 酵素		C9 酵素	C11 酵素
マルトース	+	+	ニゲロース	+	+
マルトトリオース	++	++	ネオトレハロース	+	+
マルトテトラオース	+++	+++	セロビオース	-	-
マルトペンタオース	+++	+++	ゲンチビオース	-	-
マルトヘキサオース	+++	+++	マルチトール	-	-
マルトヘプタオース	+++	+++	マルトトリイトール	+	+
イソマルトース	-	-	ラクトース	-	-
イソマルトトリオース	-	-	スクロース	-	-
パノース	-	-	エルロース	+	+
イソパノース	++	++	セラギノース	-	-
トレハロース	-	-	マルトシルグルコシド	++	++
コージビオース	+	+	イソマルトシルグルコシド	-	-

注) 酵素反応前後で、

「-」は、変化無しを示し、

「+」は、基質のスポットが僅かに減少し、他の生成物が認められるを示し、

「++」は、基質のスポットがかなり減少し、他の生成物が認められるを示し、

「+++」は、基質のスポットがほとんど消失し、他の生成物が認められるを示す。

【0118】

表 11 の結果から明らかなように、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、試験した多種の糖質のうち、グルコース重合度 3 以上で、非還元末端にマルトース構造を有する糖質によく作用することが判明した。また、グルコース重合度が 2 の糖質では、マルトース、コージビオース、ニゲロース、ネオトレハロース、マルトトリイトール、エルロースにも僅かに作用することが判明した。

【0119】

【実験 11】

<マルトオリゴ糖からの生成物>

【実験 11-1】

<生成物の調製>

濃度1%のマルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオースのそれぞれ水溶液に実験7-2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、それぞれ固形物1グラム当たり2単位（マルトースおよびマルトトリオース）、0.2単位（マルトテトラオース）、0.1単位（マルトペンタオース）加え、35℃、pH6.0で8時間作用させ、100℃で10分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の糖組成を、HPLC法を用いて測定した。HPLCは、『YMC Pack ODS-AQ303』カラム（株式会社ワイ・エム・シー製造）を用いカラム温度40℃、流速0.5ml/min水の条件で行い、検出は示差屈折計『RI-8012』（東ソー株式会社製造）を用いて行なった。その結果を表12に示す。

【0120】

【表 12】

反応で生成した糖質の種類	基 質			
	マルトース	マルトトリオース	マルトテトラオース	マルトペンタオース
グルコース	8.5	0.1	0.0	0.0
マルトース	78.0	17.9	0.3	0.0
マルトトリオース	0.8	45.3	22.7	1.9
マルトテトラオース	0.0	1.8	35.1	19.2
マルトペンタオース	0.0	0.0	3.5	34.4
マルトヘキサオース	0.0	0.0	0.0	4.6
イソマルトース	0.5	0.0	0.0	0.0
グルコシルマルトース	8.2	1.2	0.0	0.0
グルコシルマルトトリオース	2.4	31.5	6.8	0.0
X	0.0	2.1	30.0	11.4
Y	0.0	0.0	1.4	26.8
Z	0.0	0.0	0.0	1.7
その他	0.6	0.1	0.2	0.0

表中の

グルコシルマルトースは、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 6^2 -O- α -グルコシルマルトース、パノース）で、
 グルコシルマルトトリオースは、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 6^3 -O- α -グルコシルマルトトリオース）で、
 Xは、実験 11-2 で記載の α -イソマルトシルグルコトリオース（別名、 6^4 -O- α -グルコシルマルトテトラオース）で、
 Yは、実験 11-2 で記載の α -イソマルトシルグルコテトラオース（別名、 6^5 -O- α -グルコシルマルトペンタオース）で、
 Zは、未定の糖質である。

【0121】

表12の結果から明らかなように、本酵素の作用の結果、基質マルトースからは、主にグルコースと α -イソマルトシルグルコース（別名、 6^2 -O- α -グルコシルマルトース、パノース）とが生成し、基質マルトトリオースからは、主にマルトースと α -イソマルトシルグルコース（別名、 6^3 -O- α -グルコシルマルトトリオース）とが生成し、少量ながらグルコース、マルトテトラオース、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 6^2 -O- α -グルコシルマルトース、パノース）、生成物Xが生成することが判明した。基質マルトテトラオースからは、主にマルトトリオースと生成物Xとが生成し、少量ながらマルトース、マルトペンタオース、 α -イソマルトシルグルコース（別名、 6^3 -O- α -グルコシルマルトトリオース）、生成物Yが生成することが判明した。基質マルトペンタオースからは、主にマルトテトラオースと生成物Yとが生成し、少量ながらマルトトリオース、マルトヘキサオース、生成物X、生成物Zが生成することが判明した。

【0122】

基質マルトテトラオースからの主生成物である生成物X、並びに基質マルトペンタオースからの主生成物である生成物Yの単離・精製を行った。分取用HPLCカラム『YMC-Pack ODS-A R355-15S-15 12A』（株式会社ワイエムシイ製）を用いて精製し、上記のマルトテトラオースからの反応物、マルトペンタオースからの反応物それぞれから、純度99.9%以上の生成物X標品を固形物収率約8.3%で、純度99.9%以上の生成物Yを固形物収率約11.5%で単離した。

【0123】

【実験11-2】

＜生成物の構造解析＞

実験11-1の方法で得た生成物X標品および生成物Y標品を用いて、常法に従ってメチル化分析とNMR分析を行なった。メチル化分析の結果は表13にまとめた。NMR分析の結果については、 ^1H -NMRスペクトルを図21（生成物X）、図22（生成物Y）に、 ^{13}C -NMRスペクトルおよび帰属を図23（生成物X）、図24（生成物Y）、表14にまとめた。

【0124】

【表13】

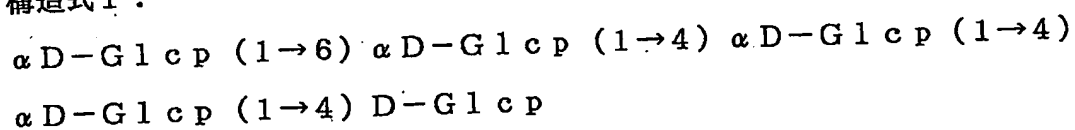
分析メチル化物の種類	組成比	
	生成物X	生成物Y
2, 3, 4-トリメチル化物	1.00	1.00
2, 3, 6-トリメチル化物	3.05	3.98
2, 3, 4, 6-テトラメチル化物	0.82	0.85

【0125】

これらの結果から、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素によるマルトテトラオースからの生成物Xは、マルトテトラオースの非還元末端グルコースの6位水酸基にグルコース基が α 結合した5糖で、構造式1で表わされる α -イソマルトシルマルトトリオース（別名、 $6^4-O-\alpha$ -グルコシルマルトテトラオース）であることが判明した。

【0126】

構造式1：

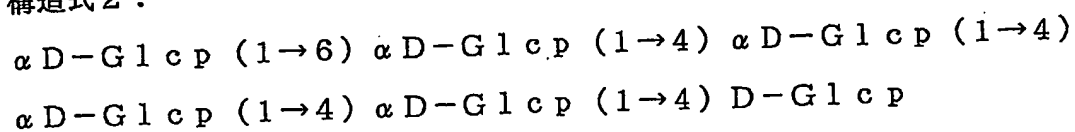


【0127】

また、マルトペンタオースからの生成物Yは、マルトペンタオースの非還元末端グルコースの6位水酸基にグルコシル基が α 結合した6糖で、構造式2で表わされる α -イソマルトシルマルトテトラオース（別名、 $6^5-O-\alpha$ -グルコシルマルトペンタオース）であることが判明した。

【0128】

構造式2：



【0129】

【表14】

グルコース番号	炭素番号	NMR化学シフト値 (ppm)	
		生成物X	生成物Y
a	1a	100.8	100.8
	2a	74.2	74.2
	3a	75.8	75.7
	4a	72.2	72.2
	5a	74.5	74.5
	6a	63.2	63.1
b	1b	102.6	102.6
	2b	74.2	74.2
	3b	75.8	75.7
	4b	72.1	72.1
	5b	74.0	74.0
	6b	68.6	68.6
c	1c	102.3	102.3
	2c	74.2	74.2
	3c	76.0	76.0
	4c	79.6	79.5
	5c	73.9	73.9
	6c	63.2	63.1
d	1d	102.2	102.3
	2d	74.0 (α), 74.4 (β)	74.2
	3d	76.0	76.0
	4d	79.8	79.5
	5d	73.9	73.9
	6d	63.2	63.1
e	1e	94.6 (α), 98.5 (β)	102.1
	2e	74.2 (α), 76.7 (β)	74.0 (α), 74.4 (β)
	3e	75.9 (α), 78.9 (β)	76.0
	4e	79.6 (α), 79.4 (β)	79.8
	5e	72.6 (α), 77.2 (β)	73.9
	6e	63.4 (α), 63.4 (β)	63.1
f	1f		94.6 (α), 98.5 (β)
	2f		74.2 (α), 76.7 (β)
	3f		76.0 (α), 78.9 (β)
	4f		79.6 (α), 79.5 (β)
	5f		72.6 (α), 77.2 (β)
	6f		63.3 (α), 63.3 (β)

【0130】

以上のことから、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のマルトオリゴ糖に対する作用は以下のように判断された。

【0131】

(1) 本酵素は、基質として、 α -1, 4結合からなるグルコース重合度が2以上のマルトオリゴ糖に作用し、その非還元性末端のグルコシル残基を他の分子の非還元性末端のグルコシル残基の6位に転移する作用を有する分子間の6-グルコシル転移を触媒して、非還元末端に6-O- α -グルコシル基を有するグルコース重合度が1増加した α -イソマルトシルグルコ糖質（別名、6-O- α -グルコシルマルトオリゴ糖）と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを生成する。

(2) 本酵素は、4-グルコシル転移も僅かに触媒し、マルトオリゴ糖から、グルコース重合度が1増加したマルトオリゴ糖と、グルコース重合度が1減じたマルトオリゴ糖とを僅かに生成する。

【0132】

【実験12】

<還元力生成試験>

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が還元力生成能を有するかどうかを調べるため、以下の試験を行った。濃度1%のマルトテトラオース水溶液に実験4-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C9由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、基質固形物1グラム当たり0.25単位加え、35℃、pH6.0で作用させ、その反応液の一部を経時的に採り、100℃で10分間保持して反応を停止し、反応液の還元力を測定した。即ち、その酵素反応前後の溶液の還元糖量をソモギー・ネルソン法で測定し、また、同時に反応前後の溶液の全糖量をアントロン硫酸法で測定し、還元力生成率(%)は以下の計算式を用いて算出した。

【0133】

【数1】

計算式：

$$\text{還元力生成率 (\%)} = \left[\frac{\text{反応後の還元糖量}}{\text{反応後の全糖量}} \right] - \left[\frac{\text{反応前の還元糖量}}{\text{反応前の全糖量}} \right] \times 100$$

【0134】

結果を表15に示す。

【0135】

【表15】

反応時間 (時間)	還元力生成率 (%)	
	C9 酵素	C11 酵素
0	0.0	0.0
1	0.0	0.1
2	0.1	0.0
4	0.1	0.1
8	0.0	0.0

【0136】

表15の結果から明らかなように、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、マルトテトラオースを基質として作用させると、反応物の還元力を実質的に増加しないこと、即ち、当該 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は加水分解作用を示さないか若しくは検出できないほど僅かなものであることが判明した。

【0137】

【実験13】

<デキストラン生成試験>

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素がデキストラン生成作用を有するかどうかを調べるため、『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience Biotechnology

and Biochemistry)』、第56巻、169乃至173(1992年)に記載の方法に準じて試験を行った。濃度1%のマルトテトラオース水溶液に実験4-2の方法で得たC9株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11株由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を、基質固形物1グラム当たり0.25単位加え、35℃、pH6.0で4時間および8時間作用させた後、100℃で15分間保持して反応を停止した。その酵素反応液の50 μ lを遠心管に入れ、それに3倍量のエタノールを加え十分に攪拌した後、4℃で30分間静置した。次いで、遠心分離(15,000rpm、5分間)し、その上清を除去した後、1mlの75w/w%のエタノールを加え攪拌して洗浄した。再度、遠心分離してその上清を除き、真空乾燥した後、1mlの脱イオン水を加え十分に攪拌した。その液中の全糖量(グルコース換算)をフェノール硫酸法で測定し、試験の全糖量とした。反応のブランクとして、100℃で10分間熱処理し失活させたバチルス グロビスポルス C9由来またはバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて同様に行い、ブランクの全糖量とした。デキストラン生成量は以下の計算式で計算した。

【0138】

計算式:

$$\text{デキストラン生成量 (mg/ml)} = [(\text{試験の全糖量}) - (\text{ブランクの全糖量})] \times 20$$

【0139】

結果を表16に示す。

【0140】

【表16】

反応時間 (時間)	生成デキストラン (mg/ml)	
	C9 酵素	C11 酵素
4	0.0	0.0
8	0.0	0.0

【0141】

表16の結果から明らかなように、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトテトラオースに作用させてもデキストランを生成しないこと、つまり、当該 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、デキストラン生成作用を実質的に有さないか、その生成量は検出限界以下であることが判明した。

【0142】

【実験14】

＜転移受容体特異性＞

各種糖質を用いて、本酵素の転移受容体になりうるかどうかの試験をした。D-グルコース、D-キシロース、L-キシロース、D-ガラクトース、D-フラクトース、D-マンノース、D-アラビノース、D-フコース、L-ソルボース、L-ラムノース、メチル- α -グルコシド、メチル- β -グルコシド、N-アセチル-グルコサミン、ソルビトール、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチピオース、マルチトール、ラクトース、スクロース、 α -サイクロデキストリン、 β -サイクロデキストリン、 γ -サイクロデキストリンの溶液を調製した。

【0143】

これらの受容体溶液（濃度1.6%）に、糖供与体として澱粉部分分解物『バインデックス#100』（濃度4%）を加え、実験4-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C9由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品または実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を糖供与体固形物1グラム当たりそれ

ぞれ1単位ずつ加え、これを30℃、pH6.0で24時間作用させた。酵素反応後の反応液を、受容体が単糖または二糖の場合はガスクロマトグラフィー法（以下GLC法と略する。）で、受容体が三糖以上の場合はHPLC法で分析し、それぞれの糖質が本酵素の転移受容体になるかを確認した。なお、GLCに於いて、GLC装置は『GC-16A』（株式会社島津製作所製）、カラムはジー・エル・サイエンス株式会社製『2%シリコンOV-17/クロモソルブW』を充填したステンレス製カラム（3mmφ×2m）、キャリアーガスは窒素ガスを流量40ml/分で160℃から320℃まで7.5℃/分の速度で昇温し、検出は水素炎イオン検出器で分析した。HPLCでは、HPLCの装置は東ソー株式会社製『CCPD』、カラムは『ODS-AQ-303』（株式会社ワイエムシー社製）、溶離液は水を流速0.5ml/分で、検出は示唆屈折形で分析した。結果を表17に示す。

【0144】

【表17】

糖質	転移生成物		糖質	転移生成物	
	C9酵素	C11酵素		C9酵素	C11酵素
D-グルコース	+	+	ソルビトール	-	-
D-キシロース	++	++	トレハロース	+	++
L-キシロース	++	++	イソマルトース	+	+
D-ガラクトース	+	+	イソマルトトリオース	+	+
D-フラクトース	+	+	セロビオース	++	++
D-マンノース	-	-	ゲンチビオース	+	+
D-アラビノース	±	±	マルチトール	+	+
D-フコース	+	+	ラクトース	++	++
L-ソルボース	+	+	スクロース	++	++
L-ラムノース	-	-	α -シクロデキストリン	-	-
メチル- α -グルコース	++	++	β -シクロデキストリン	-	-
メチル- β -グルコース	++	++	γ -シクロデキストリン	-	-
N-アセチルグルコサミン	+	+			

表中の

「-」は、受容体への糖転移物が検出されなかったを示し、

「±」は、受容体への糖転移物が検出されたが、その生成量が1%未満であったを示し、

「+」は、受容体への糖転移物が1以上10%未満であったを示し、

「++」は、受容体への糖転移物が10%以上であったを示す。

【0145】

表17の結果から明らかなように、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、転移受容体として種々の糖質が利用でき、特に、D-／L-キシロース、メチル- α -グルコシド、メチル- β -グルコシド、トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、セロビオース、ゲンチビオース、マルチトール、ラクトースおよびスクロースによく転移し、次いで、D-グルコース、D-

フラクトース、D-フコース、L-ソルボースおよびN-アセチルグルコサミンに転移し、更には、D-アラビノースにも転移することが判明した。

【0146】

以上に述べた本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の性質について、先に報告されている6-グルコシル転移作用を有する酵素、『バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience Biotechnology and Biochemistry)』、第56巻、第169乃至173頁(1992年)に記載のデキストリン・デキストラナーゼおよび『日本農芸化学会誌』、第37巻、第668乃至672頁(1963年)に記載のトランスグルコシダーゼと比較した。その結果を表18にまとめた。

【0147】

【表18】

性 質	本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素		デキストリン・デキス	トランスグルコシダ
	C9酵素	C11酵素	トラナーゼ (対照)	ーゼ (対照)
加水分解能	加水分解しない	加水分解しない	加水分解しない	主に加水分解する
デキストラン生成能	生成しない	生成しない	生成する	生成しない
至適pH	6.0-6.5	6.0	4.0-4.2	3.5
EDTAによる阻害	阻害される	阻害される	阻害されない	阻害されない

【0148】

表18から明らかなように、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、既知のデキストリン・デキストラナーゼやトランスグルコシダーゼとは全く異なる新規な理化学的性質を有することが判明した。

【149】

【実験15】

＜環状四糖の生成＞

各種糖質を用いて、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素および α -イソマルトシル転移酵素の作用による環状四糖生成試験を行った。マルトース

、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、アミロース、可溶性澱粉、澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#100』、松谷化学株式会社製）またはグリコーゲン（カキ由来、和光純薬株式会社販売）の溶液を調製した。

【0150】

これらの水溶液（濃度0.5%）に、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位とを加え、これらを30℃、pH6.0で作用させた。作用条件は、以下の4つの系で行った。

【0151】

- (1) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を24時間作用させた後、酵素を熱失活し、続いて、 α -イソマルトシル転移酵素を24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。
- (2) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを同時に24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。
- (3) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみを24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。
- (4) α -イソマルトシル転移酵素のみを24時間作用させた後、酵素を熱失活させた。

【0152】

これら熱失活させた反応液中の環状四糖の生成量を調べるために、実験1と同様の α -グルコシダーゼ・グルコアミラーゼ処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表19に示す。

【0153】

【表19】

基 質	環状四糖生成量 (%)			
	α -イソマルトシルグルコ糖質 生成酵素作用の後、 α -イソマ ルトシル転移酵素を作用	α -イソマルトシルグルコ糖質 生成酵素と α -イソマルトシル 転移酵素とを同時作用	α -イソマルトシ ルグルコ糖質生成 酵素のみの作用	α -イソマルト シル転移酵素の みの作用
マルトース	4.0	4.2	0.0	0.0
マルトトリオース	10.2	12.4	0.0	0.0
マルトテトラオース	11.3	21.5	0.0	0.0
マルトペンタオース	10.5	37.8	0.0	0.0
アミロース	3.5	31.6	0.0	0.0
可溶性澱粉	5.1	38.2	0.0	0.0
澱粉部分分解物	6.8	63.7	0.0	0.0
グリコーゲン	10.2	86.9	0.0	0.0

【0154】

表19の結果から明らかなように、試験したいずれの糖質も、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素のみの作用および α -イソマルトシル転移酵素のみの作用では、環状四糖は全く生成しなかったのに対して、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素を同時併用することにより環状四糖が生成した。その生成量は、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させた後に α -イソマルトシル転移酵素を作用させた場合には、約11%以下と比較的に低いのに対して、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを同時に作用させると、いずれの糖質でも環状四糖の生成量は向上し、特に、グリコーゲンでは約87%に増加し、澱粉部分分解物では約64%に増加することが判明した。

【0155】

この α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との同時併用における環状四糖の生成メカニズムは、両酵素の反応特性から以下のように推察される。

【0156】

(1) 本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、グリコーゲンや澱粉部分分解物などの α -1, 4グルカン鎖の非還元末端グルコース基に作用し、そのグルコース基を他の α -1, 4グルカン鎖の非還元末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に α -イソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖が生成する。

(2) α -イソマルトシル転移酵素は、非還元末端にイソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端にイソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖が生成する。

(3) 続いて、 α -イソマルトシル転移酵素は、その非還元末端にイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を有する α -1, 4グルカン鎖に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル-1, 3-イソマルトシル基を α -1, 4グルカン鎖から切り離し、環状化して環状四糖が生成する。

(4) 切り離された α -1, 4グルカン鎖は、再度、(1)から(3)の反応を受けることによって、更に、環状四糖が生成する。 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素との同時併用で、上記のように両酵素が繰り返し作用し、環状四糖の生成量が増加すると推察された。

【0157】

【実験16】

<澱粉液化程度の影響>

とうもろこし澱粉を濃度15%澱粉乳とし、これに炭酸カルシウムを0.1%加えてpH6.0に調整し、 α -アミラーゼ(商品名『ターマミール60L』(ノボ社製))を澱粉1グラム当り0.2乃至2.0%を加え、95℃で10分間反応させ、次いで、120℃で20分間オートクレーブし、約35℃に急冷して、DE3.2乃至20.5の液化溶液を得、これに、実験7-2の方法で得たパチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり2単位と、実験7-3の方法で得たパチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グ

ラム当たり20単位とを加え、35℃で24時間反応させた。100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表20に示す。

【0158】

【表20】

α -アミラーゼ使用量 澱粉当り (%)	D E	環状四糖生成率 (%)
0.2	3.2	54.5
0.4	4.8	50.5
0.6	7.8	44.1
1.0	12.5	39.8
1.5	17.3	34.4
2.0	20.5	30.8

【0159】

表20の結果から明らかなように、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とによる環状四糖の生成は、澱粉の液化の程度で影響を受け、液化の程度が低いほど、即ち、DEが低値であるほど、澱粉からの環状四糖の生成率は高く、逆に、液化の程度が高いほど、即ち、DEが高値であるほど、澱粉からの環状四糖の生成率が低いことが判明した。具体的には、澱粉の部分分解の程度は約20以下、望ましくは、DE約12以下、更に望ましくは、DE約5以下が適していることが判明した。

【0160】

【実験17】

<澱粉部分分解物濃度の影響>

澱粉部分分解物『パインデックス#100』（DE約2乃至5）の最終濃度0.5乃至40%の水溶液を調製し、それぞれに、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラ

ム当たり10単位加え、両酵素を同時併用して30℃、pH6.0で48時間作用させた後、100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表18に示す。

【0161】

【表21】

パインデックス濃度 (%)	環状四糖生成量 (%)
0.5	63.6
2.5	62.0
5	60.4
10	57.3
15	54.6
20	51.3
30	45.9
40	39.5

【0162】

表21の結果から明らかなように、澱粉部分分解物の濃度が0.5%の低濃度では、環状四糖の生成量は約64%であるのに対し、濃度40%の高濃度では、環状四糖の生成量は約40%と、基質である澱粉部分分解物の濃度に依存して環状四糖の生成量が変化することが判明した。この結果から、環状四糖の生成量は、澱粉部分分解物が低濃度であるほど高まる傾向にあることが判明した。

【0163】

【実験18】

<シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ添加効果>

澱粉部分分解物『パインデックス#100』水溶液（濃度15%）を調製し、実験7-2の方法で得たバチルス グロビスポルス C11由来の精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得たC11株由来の精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位と、バチルス・ステアロサーモフィルス由来シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）を固形物1グラム当たり0乃至0.5単位加え、両酵素を同時併用して30℃、pH6.0で48時間作用させた後、100℃で15分間熱処理して酵素を失活させた。続いて、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖を加水分解し、HPLC法で環状四糖を定量した。それらの結果を表22に示す。

【0164】

【表22】

CGTase添加量(単位)	環状四糖生成量(%)
0	54.6
2.5	60.1
5	63.1
10	65.2

【0165】

表22の結果から明らかなように、CGTaseを添加することによって、環状四糖の生成量が増加することが判明した。

【0166】

【実験19】

<環状四糖の調製>

トウモロコシ由来フィトグリコーゲン（キューピー株式会社製）の水溶液（約100L）を濃度4w/v%、pH6.0、温度30℃に調整した後、実験7-

2の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素標品を固形物1グラム当たり1単位と、実験7-3の方法で得た精製 α -イソマルトシル転移酵素標品を固形物1グラム当たり10単位加え、48時間作用させた後、100℃で10分間熱処理して酵素を失活させた。この反応液の一部を採り、HPLCで環状四糖生成量を調べたところ、糖組成として約84%であった。この反応液をpH5.0、温度45℃に調整した後、実験1と同様に α -グルコシダーゼおよびグルコアミラーゼを用いて処理し、残存する還元性オリゴ糖などを加水分解し、さらに、水酸化ナトリウムでpHを5.8に調整し温度90℃で1時間保持して、酵素を失活させ、不溶物を濾過して除去した。この濾液を逆浸透膜を用いて固形分濃度約16%まで濃縮した後、常法に従って脱色、脱塩、濾過、濃縮したところ、固形分約3,700gを含む糖液約6.2kgを得た。

【0167】

得られた糖液を、オルガノ製イオン交換樹脂『アンバーライトCR-1310(Na型)』を充填したカラム(ゲル量約225L)に供し、カラム温度60℃で流速約45L/hの条件でクロマト分離を行なった。溶出液の糖組成を実験1に記載のHPLC法でモニターし、環状四糖の純度が98%以上の画分を回収し、常法に従って脱塩、脱色、濾過、濃縮したところ、固形分約2,500gを含む糖液約7.5kgを得た。得られた糖液の糖組成をHPLC法で測定したところ、環状四糖の純度は約99.5%であった。

【0168】

【実験20】

＜環状四糖の水溶液からの結晶化＞

実験19の方法で得られた純度約98%以上の環状四糖画分をエバポレーターで固形物濃度約50%に濃縮した後、この濃縮糖液約5kgを円筒状のプラスチック容器に入れ、緩やかに回転させながら約20時間で温度を65℃から20℃まで降下させることにより晶析させたところ、白色の結晶状粉末が得られた。その顕微鏡写真の1例を図25に示す。続いて、遠心濾過器を用いて分離し結晶状物を湿重量として1,360gを回収した。さらに、60℃で3時間乾燥して環状四糖結晶状粉末を1,170g得た。得られた結晶粉末の糖組成をHPLC法

で測定したところ、環状四糖の純度は99.9%以上と極めて高純度であった。

【0169】

この環状四糖の結晶状粉末を粉末X線回折法で解析したところ、図26に示すように、主な回折角(2θ)として 10.1° 、 15.2° 、 20.3° および 25.5° を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、水分は13.0%であることがわかり、環状四糖1分子当たり5乃至6分子の水を含む結晶であることが判明した。

【0170】

さらに、この環状四糖の結晶粉末を熱重量測定したところ、図27に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 150°C までの上昇で4乃至5分子の水に相当する重量減少が認められ、続いて、温度 250°C 付近で1分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度 280°C 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖5乃至6含水結晶は、常圧において、温度を 150°C まで上昇させることにより結晶分子当たり4乃至5分子の水が離脱して1分子の水を含む結晶になり、さらに温度 250°C までに1分子の水が結晶から離脱して無水結晶になることが判明した。

【0171】

【実験21】

<環状四糖1含水結晶への変換>

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶粉末をガラス容器に入れ、予め温度 140°C に保温したオイルバス中にそのガラス容器を30分間保持した。得られた環状四糖粉末を粉末X線回折法で解析したところ、熱処理前の5乃至6含水結晶の粉末X線回折とは全く異なり、図28に示すように、主な回折角(2θ)として、 8.3° 、 16.6° 、 17.0° および 18.2° を特徴とする回折スペクトルが得られた。また、この結晶状粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、水分が約2.7%であることがわかり、環状四糖1分子当たり1分子の水を含むことが判明した。さらに、この結晶粉末を熱重量測

定したところ、図 2 9 に示す熱重量曲線が得られ、その重量変化と温度との関係から、温度 2 7 0 °C 付近で 1 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、温度 2 9 0 °C 付近から環状四糖自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。これらのことから、本発明の環状四糖結晶状物は 1 含水結晶であることが判明した。

【0 1 7 2】

【実験 2 2】

＜無水結晶への変換＞

実験 2 0 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を温度 4 0 °C 乃至 1 2 0 °C でそれぞれ 1 6 時間真空乾燥した。得られた環状四糖粉末の水分をカール・フィッシャー法で測定したところ、真空乾燥温度 4 0 °C の場合は水分が約 4 . 2 % であり、真空乾燥温度 1 2 0 °C の場合は水分が約 0 . 2 % で、実質的に無水であることが判明した。これら真空乾燥した環状四糖粉末を粉末 X 線回折法で解析したところ、真空乾燥前の 5 乃至 6 含水結晶の粉末 X 線回折および 1 含水結晶のものとは全く異なり、図 3 0 (真空乾燥温度 4 0 °C)、図 3 1 (真空乾燥温度 1 2 0 °C) に示すように、主な回折角 (2 θ) として、1 0 . 8 °、1 4 . 7 °、1 5 . 0 °、1 5 . 7 ° および 2 1 . 5 ° を特徴とする回折スペクトルが得られた。両回折スペクトル間でのピーク強度の強弱は認められるものの、基本的にピークの回折角度は同一で、結晶学的に同一無水結晶と推察された。また、回折スペクトルのベースラインは山状を呈し、真空乾燥前の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶のものおよび 1 含水結晶のものと比べ結晶化度が低下しており、非結晶状態 (アモルファス) の環状四糖が存在していることが判明した。このことから、真空乾燥 4 0 °C の場合の水分を約 4 . 2 % 含む環状四糖粉末は、その水分を含む環状四糖アモルファスと、環状四糖無水結晶とが混在する粉末と推察された。以上のことから、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を真空乾燥することにより、5 乃至 6 含水結晶は水分子を失い、非結晶状態のアモルファスと無水結晶に変換することがわかった。なお、水分 0 . 2 % の無水環状四糖粉末について、実験 2 0 と同様に熱重量分析したところ、図 3 2 に示すように、温度 2 7 0 °C 付近から環状四糖の熱分解と考えられる重量減少のみが観察された。

【0173】

【実験23】

＜環状四糖の水に対する飽和濃度＞

温度10乃至90℃での水に対する環状四糖の飽和濃度を調べるため、密栓付きガラス製容器に水10mlを入れ、それに実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を、各温度で完全に溶解する量以上の量を加えた後、ガラス容器を密封し、飽和に達するまで温度10乃至90℃で保温しながら2日間攪拌した。それぞれの温度の環状四糖飽和溶液を精密濾過して溶けていない環状四糖を除いた後、その濾液の水分を乾燥減量法で調べ、各温度での飽和濃度を求めた。結果を表23に示す。

【0174】

【表23】

温度 (℃)	飽和濃度 (%)
10	30.3
30	34.2
50	42.6
70	53.0
90	70.5

【0175】

【実験24】

＜熱安定性＞

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を水に溶解し濃度10w/v%の環状四糖水溶液を調製し、その溶液8mlをガラス製試験管に採り、密封した後、120℃で30乃至90分間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、HPLC法による純度測定を行った。着色度は、480nmにおける

1 cmセルでの吸光度により評価した。結果は表24に示す。

【0176】

【表24】

加熱時間 (分)	着色度 (A480nm)	純度 (%)
0	0.00	100
30	0.00	100
60	0.00	100
90	0.00	100

【0177】

表24の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は120℃の高温加熱でも着色はなく、糖組成の純度の低下もなく、環状四糖は熱に対して安定な糖質であることが判明した。

【0178】

【実験25】

<pH安定性>

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を各種の緩衝液(20 mM)に溶解し、環状四糖を濃度4 w/v%、pHを2乃至10に調整した環状四糖溶液を調製した。それぞれの溶液8 mlをガラス製試験管に採り、密封した後、100℃で24時間加熱した。放冷後、それら溶液の着色度の測定と、HPLC法による純度測定を行った。着色度は、480 nmにおける1 cmセルでの吸光度により評価した。結果は表25に示す。

【0179】

【表 25】

pH (緩衝液の種類)	着色度 (A _{480nm})	純度 (%)
2.0 (酢酸)	0.00	93
3.0 (酢酸)	0.00	100
4.0 (酢酸)	0.00	100
5.0 (酢酸)	0.00	100
6.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
7.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
8.0 (トリス-塩酸)	0.00	100
9.0 (アンモニウム)	0.00	100
10.0 (アンモニウム)	0.00	100

【0180】

表 25 の結果から明らかなように、環状四糖水溶液は 120℃ の高温で 24 時間加熱しても、pH 2 乃至 10 の広範囲で着色はなく、pH 2 において糖組成の純度は僅かに低下するものの、pH 3 乃至 10 の範囲では全く糖組成の純度は低下せず、環状四糖は広い pH 範囲、換言すれば、pH 3 乃至 5 の酸性側、pH 6 乃至 8 の中性側、pH 9 乃至 10 のアルカリ側で煮沸しても極めて安定な糖質であることが判明した。

【0181】

【実験 26】

＜アミノカルボニル反応＞

実験 20 の方法で得られる環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を水に溶解し、さらに、それに市販試薬特級のグリシンとリン酸緩衝液を加え、50 mM リン酸緩衝液で pH 7.0 に調整した 1 w/v % グリシンを含む 10 w/v % 環状四糖溶液を調製した。その溶液 4 ml をガラス製試験管に採り、密封した後、100℃ で 30 乃至 90 分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。着色度は、480 nm における 1 cm セルでの吸光度により評価した。結果を表 26 に示す。

【0182】

【表26】

加熱時間 (分)	着色度 (A_{480nm})
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

【0183】

表26の結果から明らかなように、環状四糖は、グリシン共存下で加熱しても着色はなく、グリシンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応（メイラード反応とも言う）を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

【0184】

【実験2.7】

＜アミノカルボニル反応＞

実験2.0の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶と市販ポリペプトン（日本製薬製）とを脱イオン水に溶かし、5w/v%ポリペプトンを含む10w/v%環状四糖溶液を調製した。その溶液4mlをガラス製試験管に採り、密封した後、120℃で30乃至90分間加熱した。室内で放冷後、それらの着色度を測定しアミノカルボニル反応性を調べた。同時に、ポリペプトンのみを含む溶液をブランクとして同様に加熱した。着色度は、480nmにおける1cmセルでの吸光度からブランクの吸光度を差し引いた値に基づいて評価した。結果を表27に示す。

【0185】

【表27】

加熱時間 (分)	着色度 (A_{480nm})
0	0.00
30	0.00
60	0.00
90	0.00

【0186】

表27の結果から明らかなように、環状四糖は、ポリペプトン共存下で加熱して、ポリペプトンとの褐変を引き起こさないこと、換言すれば、アミノカルボニル反応を起こしにくい安定な糖質であることが判明した。

【0187】

【実験28】

＜包接作用＞

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を脱イオン水に溶かし、20%水溶液を調製した。その水溶液100g当たり、メタノールは2g、エタノールは3g、酢酸は4.6gを加えて包接を行なった。その後、それぞれを濾過し濾液を凍結乾燥し、未包接物を除去した。対照として、包接能を有することが知られている分枝シクロデキストリン（商品名『イソエリートP』、マルハ株式会社販売）を用いて同様に行なった。

【0188】

凍結乾燥粉末中の包接物量を測定するために、それぞれの凍結乾燥粉末1gを5mlの水に溶かし、それに5mlのジエチルエーテルを加えて抽出を行ない、再度、抽出を繰り返した後、ジエチルエーテル中の抽出物をガスクロマトグラフィー法で定量した。結果を表28に示す。

【0189】

【表28】

包 接 物	包接量 (mg/g-凍結乾燥粉末)	
	環状四糖	イソエリートP (対照)
メ タ ノ ー ル	6.71	2.92
エ タ ノ ー ル	17.26	8.92
酢 酸	67.74	30.57

【0190】

表28の結果から明らかなように、環状四糖は包接能を有しており、その包接能は、分枝サイクロデキストリンと比べ、重量当たり約2倍も高いことが判明した。

【0191】

【実験29】

＜甘味度＞

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を脱イオン水に溶かし、固形物濃度10%水溶液を調製し、この環状四糖10%水溶液を基準とし、蔗糖（市販グラニュー糖）の濃度を変え、パネラー5名で官能試験を行なった。その結果、環状四糖の甘味度は、蔗糖の約20%であった。

【0192】

【実験30】

＜消化性試験＞

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を用いて、『日本栄養食糧学会誌』、第43巻、第23乃至29頁（1990年）に記載の岡田等の方法に準じて、試験管内での唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼ、小腸粘膜酵素による環状四糖の消化性を調べた。対照として、難消化性糖質として知られているマルチトールを用いて行なった。結果を表29に示す。

【0193】

【表 29】

消 化 酵 素	消化酵素による分解率 (%)	
	環状四糖	マルチトール (対照)
唾液アミラーゼ	0. 0	0. 0
合成胃液	0. 0	0. 0
膵液アミラーゼ	0. 0	0. 0
小腸粘膜酵素	0. 74	4. 0

【0194】

表 29 の結果から明らかなように、環状四糖は、唾液アミラーゼ、合成胃液、膵液アミラーゼで全く消化されず、小腸粘膜酵素によって僅かに消化されたが、その程度は 0. 74 % と低値であり、対照の難消化性糖質マルチトールの値と比較すると 1/5 以下であり、環状四糖が極めて消化されにくい糖質であることが判明した。

【0195】

【実験 31】

＜醗酵性試験＞

実験 20 の方法で得られる環状四糖 5 乃至含水結晶を用いて、『ジャーナル・オブ・ニュートリショナル・サイエンス・アンド・ビタミンロジー (Journal of Nutritional Science and Vitamino logy)』、第 37 巻、第 529 乃至 544 頁 (1991 年) に記載の Oku 等の方法に準じて、ラット盲腸内容物による環状四糖の発酵性を調べた。盲腸内容物は、ウィスター系雄ラットをエーテル麻酔下で屠殺し嫌氣的に採取し、4 倍量の 0. 1M 炭酸水素ナトリウム水溶液に懸濁したものをを用いた。環状四糖は盲腸内容物重量当たり約 7 % を添加し、添加直後および 12 時間後に残存する環状四糖量はガスクロマトグラフィー法で定量した。その結果、添加直後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 68. 0 mg、12 時間後の環状四糖濃度は盲腸内容物 g 当たり 63. 0 mg であり、93 % が醗酵されず残存していることがわかり、環状四糖は極めて醗酵されにくい糖質であることが判明した。

【0196】

【実験32】

＜資化性試験＞

実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を用いて、『腸内フローラと食物因子』、光岡知足編、学会出版センター（1984年）に記載の方法に準じて、各種腸内細菌の資化性を調べた。即ち、予め培養しておいた新鮮な菌を、環状四糖を0.5%添加したPYF培地5mlに約 10^7 CFU接種し、嫌気条件下で37℃、4日間培養した。対照として、資化されやすい糖質グルコースを用いて行なった。資化性の判定は、培養後の培養液のpHが、6.0以上の場合、資化されない（－）とし、6.0未満の場合、資化される（＋）とした。さらに、培養液中に残存する糖質をアンスロン法で測定し糖質の減少量を調べ、資化性の判定を確認した。結果を表30に示す。

【0197】

【表30】

腸内細菌株	資化性	
	環状四糖	ゲルコース(対照)
<i>Bacteroides vulgatus</i> JCM5826	-	+
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275	-	+
<i>Clostridium perfringens</i> JCM3816	-	+
<i>Escherichia coli</i> IFO3301	-	+
<i>Eubacterium aerofaciens</i> ATCC25986	-	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> JCM1132	-	+

【0198】

表30の結果から明らかなように、環状四糖は、試験した腸内細菌株のいずれにも資化されなく、対照のグルコースはいずれにも資化されることがわかり、環状四糖が腸内細菌に極めて資化されにくい糖質であることが判明した。

【0199】

【実験33】

<急性毒性試験>

マウスを使用して、実験20の方法で得られる環状四糖5乃至6含水結晶を経口投与して急性毒性試験を行なった。その結果、環状四糖は低毒性の物質で、投与可能な最大投与量においても死亡例は認められなかった。従って、正確な値とはいえないが、そのLD50値は、50g/kgマウス体重以上であった。

【0200】

以上の実験30乃至33の結果から、環状四糖は、経口摂取しても、消化、吸収されにくく、無カロリー乃至低カロリーの可食素材として、ダイエット甘味料、高甘味度甘味料の賦形剤、ダイエット飲食物の増粘剤、増量剤、賦形剤、更には、食物繊維、脂肪代替食品材料などとしての利用が期待できる。

【0201】

以下、本発明の環状四糖、それを含む糖質の製造方法を実施例Aで、環状四糖、それを含む糖質を含有せしめた組成物を実施例Bで示す。

【0202】 6

【実施例A-1】

パチルス グロビスポルス C9 (FERM BP-7143) を実験3の方法に準じて、ファーメンターで48時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約18Lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を8.8単位/mlと α -イソマルトシル転移酵素を26.7単位/mlとを含む濃縮酵素液約1Lを回収した。

【0203】

馬鈴薯澱粉乳を濃度約2%澱粉乳とし、これに最終濃度1mMとなるように塩化カルシウムを加え、pH6.0に調整し、95℃に約20分間加熱して糊化を行い、次いで約35℃に冷却し、これに前記方法で調製した α -イソマルト

シルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物1グラム当り0.25mlの割合になるように加え、pH6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に、濃縮し、噴霧乾燥して、環状四糖含有粉末を原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。

【0204】

本品は、固形物当たり、グルコース0.7%、イソマルトース1.4%、マルトース11.1%、環状四糖62.1%、およびその他の糖質を24.7%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0205】

【実施例A-2】

馬鈴薯澱粉を濃度約6%澱粉乳とし、これに濃度0.1%となるように炭酸カルシウムを加え、pH6.0に調整し、これに α -アミラーゼ（商品名『ターマイル60L』、ノボ社製）を澱粉固形物グラム当り0.2%になるように加え、95℃で10分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約35℃に急冷してDE約4の液化溶液を得、これに実施例A-1の方法で調製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮液を澱粉固形物1グラム当り0.25mlの割合になるように加え、pH6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃に加熱し10分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。

【0206】

本品は、固形物当たり、グルコース0.9%、イソマルトース1.5%、マルトース11.3%、環状四糖60.1%、およびその他の糖質を26.2%含有

しており、温和な甘味、適度の粘度、保温性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0207】

【実施例 A-3】

バチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) を実験6の方法に準じて、ファーマンターで48時間培養した。培養後、SF膜を用いて除菌濾過し、約18Lの培養濾液を回収し、更に、その濾液をUF膜濃縮し、本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を9.0単位/mlと α -イソマルトシル転移酵素を30.2単位/mlとを含む濃縮酵素液約1Lを回収した。タピオカ澱粉を濃度約25%澱粉乳とし、これに α -アミラーゼ（商品名『ネオスピターゼ』、ナガセ生化学工業株式会社製）を澱粉固形物グラム当り0.2%加え、85乃至90℃で約20分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約35℃に急冷してDE約4の液化溶液を得、これに上記の方法で調製した α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物1グラム当り0.25mlの割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉固形物1グラム当り10単位になるように加え、pH6.0、温度35℃で48時間反応させた。その反応液を95℃で30分間保った後、pH5.0、温度50℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製）を固形物1グラム当たり300単位加え、24時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物1グラム当たり30単位加え、17時間反応させ、その反応液を95℃に加熱し30分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。

【0208】

本シラップは、固形物当り、グルコース38.4%、環状四糖58.1%、そ

の他の糖質を3.5%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0209】

【実施例A-4】

とうもろこし澱粉を濃度約20%の澱粉乳とし、これに炭酸カルシウム0.1%加え、pH6.5に調整し、 α -アミラーゼ（商品名『ターマミール60L』、ノボ社製）を澱粉グラム当たり0.3%加え、95℃で15分間反応させ、次いで120℃に20分間オートクレーブし、更に約35℃に急冷してDE約4の液化溶液を得、これに実施例A-3の方法で得た α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを含む濃縮酵素液を澱粉固形物1グラム当たり0.25mlの割合になるように加え、更にシクロマルトデキストリンゲルカノトランスフェラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）を澱粉固形物1グラム当たり10単位になるように加え、pH6.0、温度35で48時間反応させた。その反応液を95℃で30分間保った後、pH5.0、温度50℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ剤（商品名『トランスグルコシダーゼ L「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物1グラム当たり300単位加え、24時間反応させ、更にグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製）を固形物1グラム当たり30単位加え、17時間反応させ、その反応液を95℃に加熱し30分間保った後、冷却し、濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製し、更に濃縮して濃度60%の環状四糖含有シラップを原料澱粉固形物当たり収率約90%で得た。

【0210】

本シラップは、固形物当り、グルコース34.2%、環状四糖62.7%、その他の糖質を3.1%含有しており、温和な甘味、適度の粘度、保湿性、包接性を有し、甘味料、呈味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利

に利用できる。

【0211】

【実施例A-5】

実施例A-3の方法で得られた環状四糖含有シラップを、強酸性カチオン交換樹脂（商品名『アンバーライトCR-1310（Na型）』、オルガノ株式会社製）を用いたカラム分画を行なった。樹脂を内径5.4cmのジャケット付きステンレス製カラム4本に充填し、直列につなぎ樹脂層全長20mとした。カラム内温度60℃に維持しつつ、糖液を樹脂に対して5v/v%加え、これに60℃の温水をSV0.13で流して分画し、溶出液の糖組成をHPLC法でモニターし、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、環状四糖高含有液を原料澱粉固形物当たり収率約21%で得た。本高含有液は、固形物当たり約98%の環状四糖を含有していた。

【0212】

本溶液を濃度約70%に濃縮した後、助晶缶にとり、種晶として環状四糖5乃至6含水結晶約2%を加えて徐冷し、晶出率約45%のマスキットを得た。本マスキットを乾燥塔上のノズルより 150 kg/cm^2 の高圧にて噴霧した。これと同時に85℃の熱風を乾燥塔の上部より送風し、底部に設けた移送用金網コンベア上に結晶粉末を捕集し、コンベアの下より45℃の温風を送りつつ、該粉末を乾燥塔外に徐々に移動させて、取り出した。この結晶粉末を熟成塔に充填して温風を送りつつ、10時間熟成させ、結晶化と乾燥を完了し、環状四糖5乃至6含水結晶粉末を得た。

【0213】

本品は、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0214】

【実施例A-6】

実施例 A-4 の方法で得られた環状四糖含有シラップを原糖液とし、環状四糖の含量を高めるため、実施例 A-5 の方法に準じて塩型強酸性カチオン交換樹脂を用いるカラムクロマトグラフィーを行なって、環状四糖高含有画分を採取し、精製して、環状四糖高含有液を原料澱粉固形物当たり収率約 60% で得た。本高含有液は、固形物当たり約 90% の環状四糖を含有していた。

【0215】

本溶液を濃度約 85% に濃縮して助晶機にとり、攪拌しつつ徐冷して助晶し、これをプラスチック製バットに取り出し、室温で 2 日間放置し、晶出熟成させてブロックを調製した。次いで、本ブロックを切削機にて粉碎して環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を得た。

【0216】

本品は、実質的に吸湿性を示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物に有利に利用できる。

【0217】

【実施例 A-7】

実施例 A-6 の方法で得られた環状四糖高含有液を、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水スプレーし洗浄して高純度の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶を固形物当たり約 55% の収率で得た。

【0218】

本品は、固形物当り 98% 以上の高純度環状四糖 5 乃至 6 含水結晶であって、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などに

も有利に利用できる。

【0219】

【実施例A-8】

トウモロコシ由来フィトグリコーゲン5.0w/v%、酵母抽出物『アサヒミースト』1.0w/v%、リン酸二カリウム0.1w/v%、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06w/v%、硫酸マグネシウム・7水塩0.05w/v%、及び水からなる液体培地を、容量30Lのファーマンターに約20L入れて、121℃、20分間滅菌し、冷却して温度27℃とした後、実験6の方法に準じて種培養したバチルス グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) の種培養液1v/v%を接種し、温度27℃、pH6.0乃至7.0に保ちつつ、72時間通気攪拌培養した。その培養液を121℃、20分間加熱殺菌した後、冷却し、遠心分離し、その上清を回収し、更に、その上清をUF膜濾過して得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H型およびOH型イオン交換樹脂により脱塩して精製して、環状四糖含有液を原料フィトグリコーゲン固形物当たり収率約40%で得た。本含有液は、固形物当たり約87%の環状四糖を含有していた。

【0220】

本環状四糖含有液を、濃縮しながら連続晶析させ、得られるマスキットをバスケット型遠心分離機で分蜜し、結晶を少量の水スプレーし洗浄して純度98%以上の高純度環状四糖5乃至6含水結晶を原料フィトグリコーゲン固形物当たり収率約25%で得た。

【0221】

本品は、高純度の環状四糖5乃至6含水結晶であって、還元性が極めて低く、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品など各種組成物、更には、工業試薬、化学原料などにも有利に利用できる。

【0222】

【実施例 B-1】

＜甘味料＞ 実施例 A-7 の方法に準じて得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 0.8 重量部に、トレハロース含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）0.2 重量部、 α -グリコシルステビオシド（東洋精糖株式会社販売、商品名『 α G スイート』）0.01 重量部、および L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（商品名『アスパルテム』）0.01 重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約 2 倍の甘味度を有している。本品のカロリーは、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶が難消化性、難発酵性で実質的に無カロリーであることから、甘味度当たり蔗糖の約 10 分の 1 である。しかも、本品は、室温保存下、変質劣化の懸念が無く、安定である。従って、本品は、高品質の低カロリー、低う蝕性甘味料として好適である。

【0 2 2 3】

【実施例 B-2】

＜ハードキャンディー＞

濃度 55% 蔗糖溶液 100 重量部に実施例 A-2 の方法で得た環状四糖含有シラップ 50 重量部を加熱混合し、次いで減圧下で水分 2% 未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 0.6 重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成形し、製品を得た。本品は歯切れ、呈味、風味とも良好で、蔗糖の晶出も起こさず、吸湿性少なく、ダレも起こさない安定で高品質のハードキャンディーである。

【0 2 2 4】

【実施例 B-3】

＜チューインガム＞

ガムベース 3 重量部を柔らかくなる程度に加熱溶融し、これに無水結晶マルクトール 2 重量部、キシリトール 2 重量部、実施例 A-7 の方法に準じて得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶 2 重量部、およびトレハロース含水結晶 1 重量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合し、常法に従って、ロールにより練り合わせ、成形、包装して製品を得た。本品は、テクスチャー、呈味、風味良好で、低う

蝕性、低カロリーのチューインガムとして好適である。

【0225】

【実施例B-4】

<加糖練乳>

原乳100重量部に実施例A-5の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末2重量部および蔗糖2重量部を溶解し、プレートヒーターで加熱殺菌し、次いで濃度70%に濃縮し、無菌状態で缶詰して製品を得た。本品は、温和な甘味で風味も良く、フルーツ、コーヒー、ココア、紅茶などの調味用に有利に利用できる。

【0226】

【実施例B-5】

<乳酸菌飲料>

脱脂粉乳175重量部、実施例A-4の方法で得た環状四糖含有シラップ130重量部およびラクトスクロース高含有粉末（株式会社林原商事販売、登録商標『乳果オリゴ』）50重量部を水1,150重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部接種し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好で、オリゴ糖、環状四糖を含有し、乳酸菌を安定に保つだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用、整腸作用を有する乳酸菌飲料として好適である。

【0227】

【実施例B-6】

<粉末ジュース>

噴霧乾燥により製造したオレンジ果汁粉末33重量部に対して、実施例A-7の方法に準じて得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末50重量部、無水結晶マルチトール10重量部、無水クエン酸0.65重量部、リンゴ酸0.1重量部、2-O- α -グルコシル-L-アスコルビン酸0.2重量部、クエン酸ソーダ0.1重量部、プルラン0.5重量部および粉末香料の適量をよく混合攪拌し、粉碎し微粉末にして、これを流動層造粒機に仕込み、排風温度40℃とし、これに実施例A-5の方法で得た環状四糖高含有濃縮液をバインダーとして適量スプレーし

、30分間造粒し、計量、包装して製品を得た。本品は、果汁含有率約30%の粉末ジュースである。又、本品は、異味、異臭がなく、高品質で、低カロリーのジュースとして商品価値の高いものである。

【0228】

【実施例B-7】

＜カスタードクリーム＞

コーンスターチ100重量部、実施例A-2の方法で得た環状四糖含有シラップ100重量部、トレハロース含水結晶60重量部、蔗糖40重量部、および食塩1重量部を十分に混合し、鶏卵280重量部を加えて攪拌し、これに沸騰した牛乳1,000重量部を徐々に加え、更に火にかけて攪拌を続け、コーンスターチが完全に糊化して全体が半透明になった時に火を止め、これを冷却して適量のバニラ香料を加え、計量、充填、包装して製品を得た。本品は、なめらかな光沢を有し、風味良好で、澱粉の老化も抑制され、高品質のカスタードクリームである。

【0229】

【実施例B-8】

＜チョコレート＞

カカオペースト40重量部、カカオバター10重量部および実験21の方法に準じて得た環状四糖1含水結晶50重量部を混合してレファイナーに通して粒度を下げた後、コンチェに入れて50℃で2昼夜練り上げた。この間にレシチン0.5重量部を添加して十分に分散させた。次いで、温度調節機で31℃に調節し、バターの固まる直前に型に流し込み、泡抜きし、10℃の冷却トンネルを通過させて固化させた。これを型抜きして包装し、製品を得た。本品は、吸湿性がなく、色、光沢共に良く、内部組織も良好であり、口中でなめらかに溶け、上品な甘味とまろやかな風味を有する。又本品は、低う蝕性、低カロリーのチョコレートとして有用である。

【0230】

【実施例B-9】

＜ういろうの素＞

米粉90重量部に、コーンスターチ20重量部、無水結晶マルチトール70重量部、実施例A-1の方法で得た環状四糖含有粉末50重量部、およびプルラン4重量部を均一に混合してういろの素を製造した。ういろの素と適量の抹茶と水とを混練し、これを容器に入れて60分間蒸し上げて抹茶ういろを製造した。本品は、照り、口当たりも良好で、風味も良い。又、澱粉の老化も抑制され、日持ちも良く、低カロリーのういろとしても好適である。

【0231】

【実施例B-10】

<あん>

原料あずき10重量部に、常法に従って、水を加えて煮沸し、洗切り、あく抜きし、水溶性夾雑物を除去して、あずきつぶあん約21重量部を得た。この生あんに蔗糖14重量部、実施例A-3の方法で得た環状四糖含有シラップ5重量部および水4重量部を加えて煮沸し、これに少量のサラダオイルを加えてつぶあんを壊さないように練り上げ、製品のあんを約35重量部得た。本品は、色焼け、離水もなく安定で、舌触り、風味良好で、あんパン、まんじゅう、団子、最中、氷菓などの製菓材料として好適である。

【0232】

【実施例B-11】

<パン>

小麦粉100重量部、イースト2重量部、蔗糖5重量部、実施例A-1の方法で得た環状四糖含有粉末1重量部および無機フード0.1重量部を、常法に従って、水でこね、中種を26℃で2時間発酵させ、その後30分間熟成、焼き上げた。本品は、色相、すだちとも良好で、適度な弾力、温和な甘味を有する高品質のパンである。

【0233】

【実施例B-12】

<ハム>

豚もも肉1,000重量部に食塩15重量部および硝酸カリウム3重量部を均一にすり込んで、冷室に1昼夜堆積する。これを水500重量部、食塩100重

量部、硝酸カリウム 3 重量部、実施例 A-5 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 4 0 重量部および香辛料からなる塩漬液に冷室で 7 日間漬け込み、次いで、常法に従い、冷水で洗浄し、ひもで巻き締め、薫煙し、クッキングし、冷却、包装して製品を得た。本品は、色合いもよく、風味良好な高品質のハムである。

【0 2 3 4】

【実施例 B-1 3】

＜粉末ペプチド＞

4 0 % 食品用大豆ペプチド溶液（不二製油株式会社販売、商品名『ハイニュー ト S』）1 重量部に、実施例 A-6 の方法で得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 2 重量部を混合し、プラスチック製バットに入れ、5 0 ℃で減圧乾燥し、粉碎して粉末ペプチドを得た。本品は風味良好で、プレミックス、冷菓などの低カロリー製菓材料として有用であるのみならず、経口流動食、経管流動食のための難消化性の食物繊維、整腸材料としても有用である。

【0 2 3 5】

【実施例 B-1 4】

＜粉末卵黄＞

生卵から調製した卵黄をプレート式加熱殺菌機で 6 0 乃至 6 4 ℃で殺菌し、得られる液状卵黄 1 重量部に対して、実験 2 2 の方法で得た環状四糖無水結晶含有粉末 4 重量部の割合で混合した後、バットに移し、一夜放置して、環状四糖 5 乃至 6 含水結晶に変換させてブロックを調製した。本ブロックを切削機にかけて粉末化し、粉末卵黄を得た。

【0 2 3 6】

本品は、プレミックス、冷菓、焼菓子、乳化剤などの低カロリー製菓材料として有用であるのみならず経口流動食、経管流動食のための難消化の性食物繊維、整腸材料としても有用である。又、美肌剤、育毛剤などとしても有利に利用できる。

【0 2 3 7】

【実施例 B-1 5】

＜浴用剤＞

ユズの皮ジュース1重量部に対して、実験22の方法で環状四糖無水結晶含有粉末10重量部の割合で混合し、環状四糖5乃至6含水結晶を晶出、熟成させた後、粉末化して、ユズの皮エキス含有環状四糖5乃至6含水結晶粉末を得た。

【0238】

本粉末5重量部に、焼塩90重量部、トレハロース含水結晶2重量部、無水ケイ酸1重量部および α -グルコシル ヘスペリジン（株式会社林原販売、商品名 α Gヘスペリジン）0.5重量部を混合して浴用剤を製造した。

【0239】

本品は、ユズの香りも豊かで、入浴用の湯に100乃至10,000倍に希釈して利用すればよく、入浴後は、肌がしっとりしなめらかで、湯冷めしない高品質の浴用剤である。

【0240】

【実施例B-16】

＜化粧用クリーム＞

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール2重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン5重量部、実施例A-8の方法で得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末2重量部、 α -グルコシル ルチン（株式会社林原販売、商品名 α Gルチン）1重量部、流動パラフィン1重量部、トリオクタン酸グリセリン10重量部および防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これにL-乳酸2重量部、1,3-ブチレングリコール5重量部および精製水66重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し、化粧用クリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

【0241】

【実施例B-17】

＜練歯磨＞

第二リン酸カルシウム45重量部、ラウリル硫酸ナトリウム1.5重量部、グリセリン25重量部、ポリオキシエチレンソルビタンラウレート0.5重量部、実

施例A-2の方法で得た環状四糖含有シラップ15重量部、サッカリン0.02重量部および防腐剤0.05重量部を水13重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、界面活性剤の洗浄力を落とすことなく、嫌味を改良し、使用後感も良好である。

【0242】

【実施例B-18】

<流動食用固体製剤>

実施例A-6の方法に準じて得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末100重量部、トレハロース含水結晶200重量部、マルトテトラオース高含有粉末200重量部、粉末卵黄270重量部、脱脂粉乳209重量部、塩化ナトリウム4.4重量部、塩化カリウム1.8重量部、硫酸マグネシウム4重量部、チアミン0.01重量部、アスコルビン酸ナトリウム0.1重量部、ビタミンEアセテート0.6重量部およびニコチン酸アミド0.04重量部からなる配合物を調製し、この配合物25グラムずつ防湿性ラミネート小袋に充填し、ヒートシールして製品を得た。

【0243】

本品は、環状四糖により難消化性の食物繊維を強化し、整腸作用に優れた流動食である。1袋分を約150乃至300mlの水に溶解して流動食とし、経口的、または鼻腔、胃、腸などへ経管的使用方法により利用され、生体へのエネルギー補給用に有利に利用できる。

【0244】

【実施例B-19】

<錠剤>

アスピリン50重量部に実施例A-7の方法に準じて得た環状四糖5乃至6含水結晶粉末14重量部、コーンスターチ4重量部を十分に混合した後、常法に従って打錠機により打錠して厚さ5.25mm、1錠680mgの錠剤を製造した。

【0245】

本品は、環状四糖の賦形性を利用したもので、吸湿性がなく、物理的強度も充

分にあり、しかも水中での崩壊はきわめて良好である。

【0 2 4 6】

【実施例 B - 2 0】

＜糖衣錠＞

重量 1 5 0 m g の素錠を芯剤とし、これに実施例 A - 7 の方法に準じて得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 4 0 重量部、プルラン（平均分子量 2 0 万）2 重量部、水 3 0 重量部、タルク 2 5 重量部および酸化チタン 3 重量部からなる下掛け液を用いて錠剤重量が約 2 3 0 m g になるまで糖衣し、次いで、同じ環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 6 5 重量部、プルラン 1 重量部および水 3 4 重量部からなる上掛け液を用いて、糖衣し、更に、ロウ液で艶出しして光沢のある外観の優れた糖衣錠を得た。本品は、耐衝撃性にも優れており、高品質を長期間維持する。

【0 2 4 7】

【実施例 B - 2 1】

＜外傷治療用膏薬＞

実施例 A - 7 の方法に準じて得た環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末 1 0 0 重量部およびマルトース 3 0 0 重量部に、ヨウ素 3 重量部を溶解したメタノール 5 0 重量部を加え混合し、更に 1 0 w / v % プルラン水溶液 2 0 0 重量部を加えて混合し、適度の延び、付着性を示す外傷治療用膏薬を得た。本品は、環状四糖によりヨウ素、メタノールの揮散を防止し、経時変化が少ない商品価値の高い膏薬である。

【0 2 4 8】

又、本品は、ヨウ素による殺菌作用のみならず、マルトースによる細胞へのエネルギー補給剤としても作用することから治癒期間が短縮され、創面もきれいに治る。

【0 2 4 9】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明は、新規な α - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法並びに用途に関し、詳細には、新規な α - イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とこの酵素を製造する方法、この酵素を産生する微生物、この酵

素を用いた α -グルコシル転移方法、 α -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、加えて、この酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを併用したサイクロ { $\rightarrow 6$ } - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖の製造方法、並びにこれら糖質を含有せしめた組成物に関する。本発明によれば、産業上有用なサイクロ { $\rightarrow 6$ } - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖、これを含む糖質および組成物を、工業的に安価かつ大量に製造することが可能となった。斯かる環状四糖またはこれを含む糖質は、実質的に非還元性乃至低還元性で、アミノカルボニル反応を起こしにくく、吸湿性も示さず、取扱いが容易であり、温和な低甘味、適度の粘度、保湿性、包接性、難消化性、を有し、甘味料、低カロリー食品素材、呈味改良剤、風味改良剤、品質改良剤、離水防止剤、安定剤、賦形剤、包接剤、粉末化基材などとして、各種飲食物、化粧品、医薬品などの組成物に有利に利用できる。

【0250】

本発明は斯くも顕著な作用効果を有する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

【0251】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> α -Isomaltosylgluco-saccharide-forming enzyme, its preparation and uses

<130> 10085401

<160> 10

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 1

Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile

1

5

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 2

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Asn Gly

1

5

10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 3

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly

1

5

10

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 4

Ile Asp Gly Val Tyr His Ala Pro

1

5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 5

Asp Ala Ser Ala Asn Val Thr Thr

1

5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 6

Trp Ser Leu Gly Phe Met Asn Phe

1

5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 7

Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe

1

5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 8

Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr

1

5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 9

Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser

1

5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> *Bacillus globisporus*

<400> 10

Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser

1

5

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の α -イソマルトシル転移酵素反応により得られた糖質を高速液体クロマトグラフィーにかけたときの溶出パターンを示す図である。

【図 2】

本発明の α -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMRスペクトル) を示す図である。

【図 3】

本発明の α -イソマルトシル転移酵素反応により得られた環状四糖の核磁気共鳴スペクトル (^{13}C -NMRスペクトル) を示す図である。

【図 4】

環状四糖の構造が、サイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow) であることを示す図である。

【図 5】

本発明のパチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 6】

本発明のパチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 7】

本発明のパチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図 8】

本発明のパチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 9】

本発明のバチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 10】

本発明のバチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 11】

本発明のバチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

【図 12】

本発明のバチルス グロビスポルス C9 由来の α -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 13】

本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 14】

本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 15】

本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の温度安定性を示す図である。

【図 16】

本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 17】

本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシル転移酵素の酵素活性に及ぼす温度の影響を示す図である。

【図 18】

本発明のバチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシル転移酵素

の酵素活性に及ぼす pH の影響を示す図である。

【図 19】

本発明のパチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシル転移酵素の温度安定性を示す図である。

【図 20】

本発明のパチルス グロビスポルス C11 由来の α -イソマルトシル転移酵素の pH 安定性を示す図である。

【図 21】

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトトリオースの ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

【図 22】

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトテトラオースの ^1H -NMR スペクトルを示す図である。

【図 23】

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトトリオースの ^{13}C -NMR スペクトルを示す図である。

【図 24】

本発明の α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素反応により得られた α -イソマルトシルマルトテトラオースの ^{13}C -NMR スペクトルを示す図である。

【図 25】

本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶の顕微鏡写真をディスプレイ上に表示した中間調画像である。

【図 26】

本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶状粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

【図 27】

本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶状粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

【図 28】

本発明の環状四糖 1 含水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

【図 2 9】

本発明の環状四糖 1 含水結晶粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

【図 3 0】

本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を 4 0℃で真空乾燥して得られる環状四糖無水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

【図 3 1】

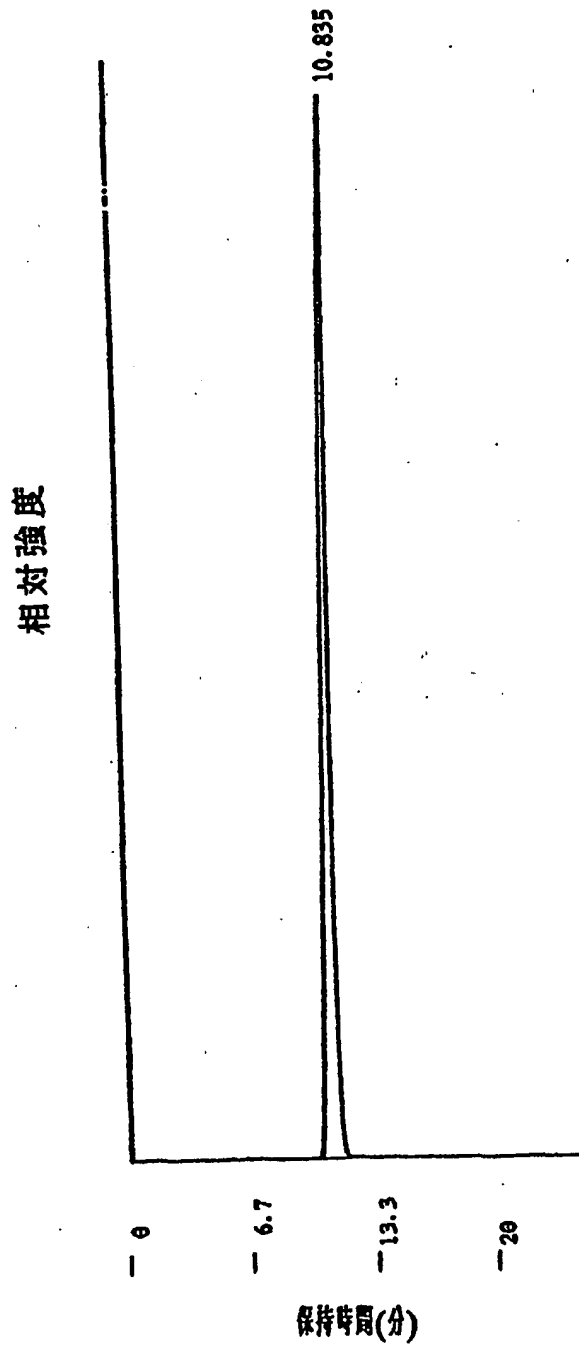
本発明の環状四糖 5 乃至 6 含水結晶粉末を 1 2 0℃で真空乾燥して得られる環状四糖無水結晶粉末を粉末 X 線回折法で解析したときの回折スペクトルを示す図である。

【図 3 2】

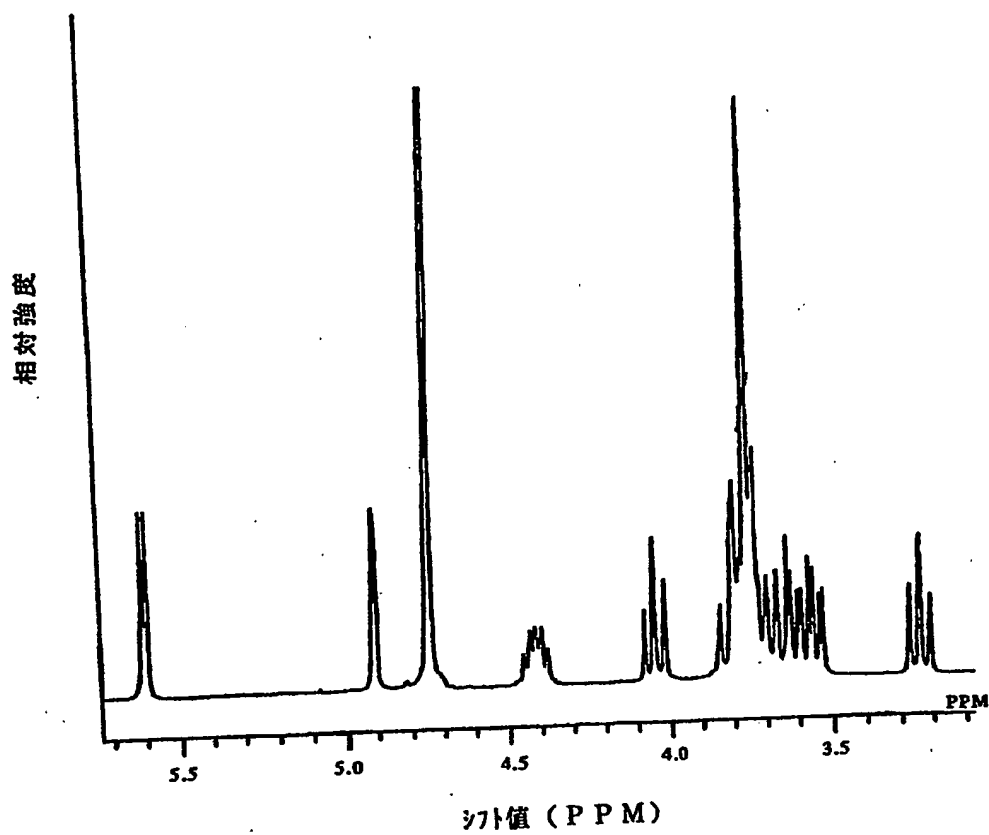
本発明の無水環状四糖粉末を熱重量測定したときの熱重量曲線を示す図である。

【書類名】 図面

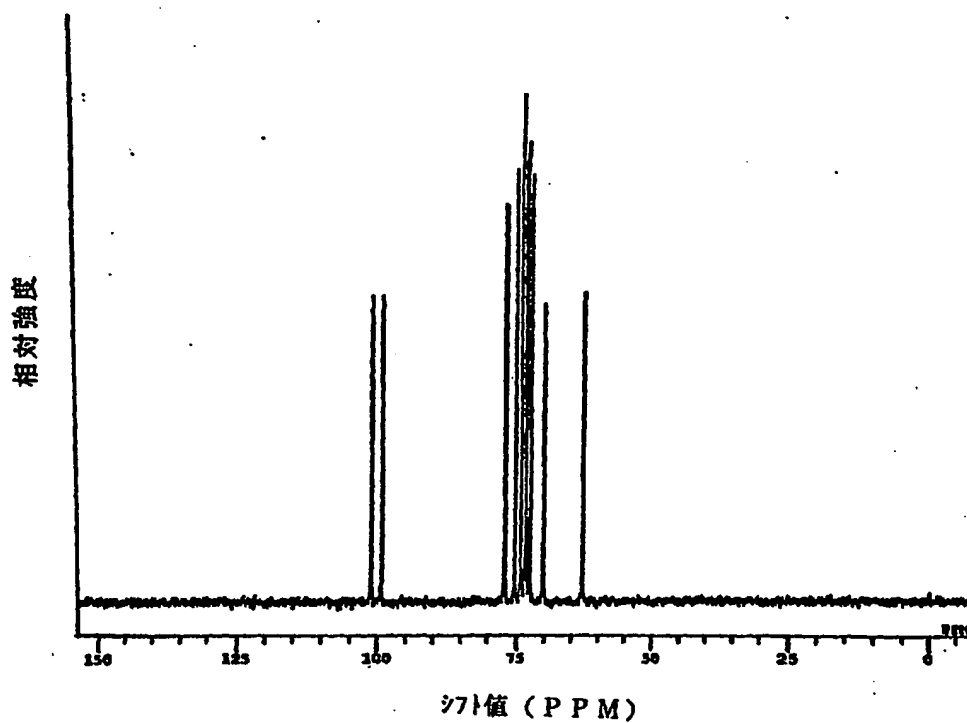
【図1】



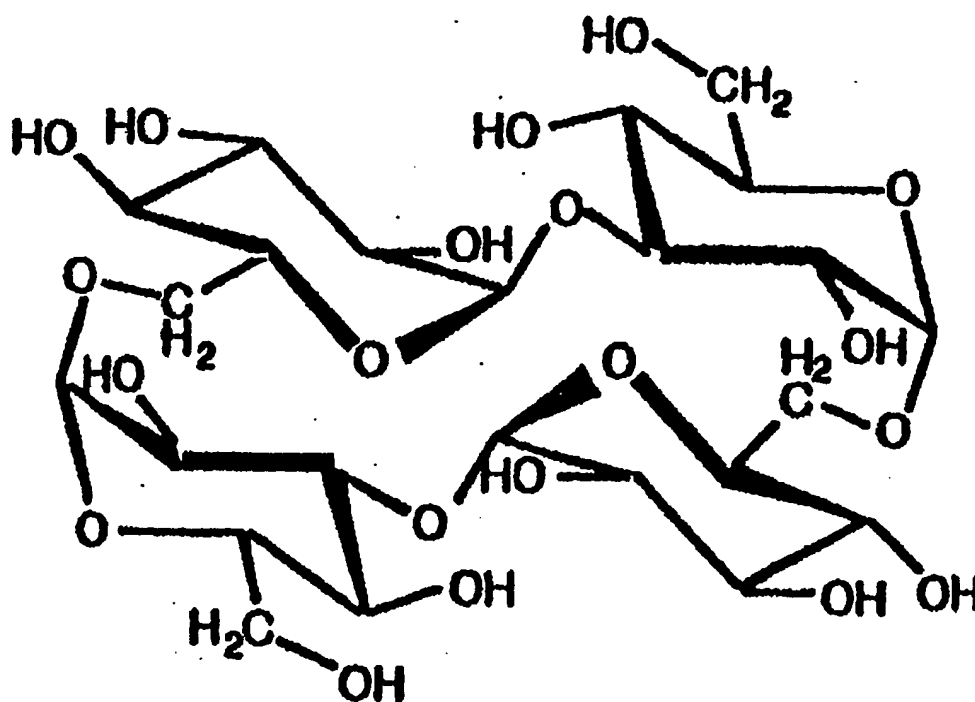
【図2】



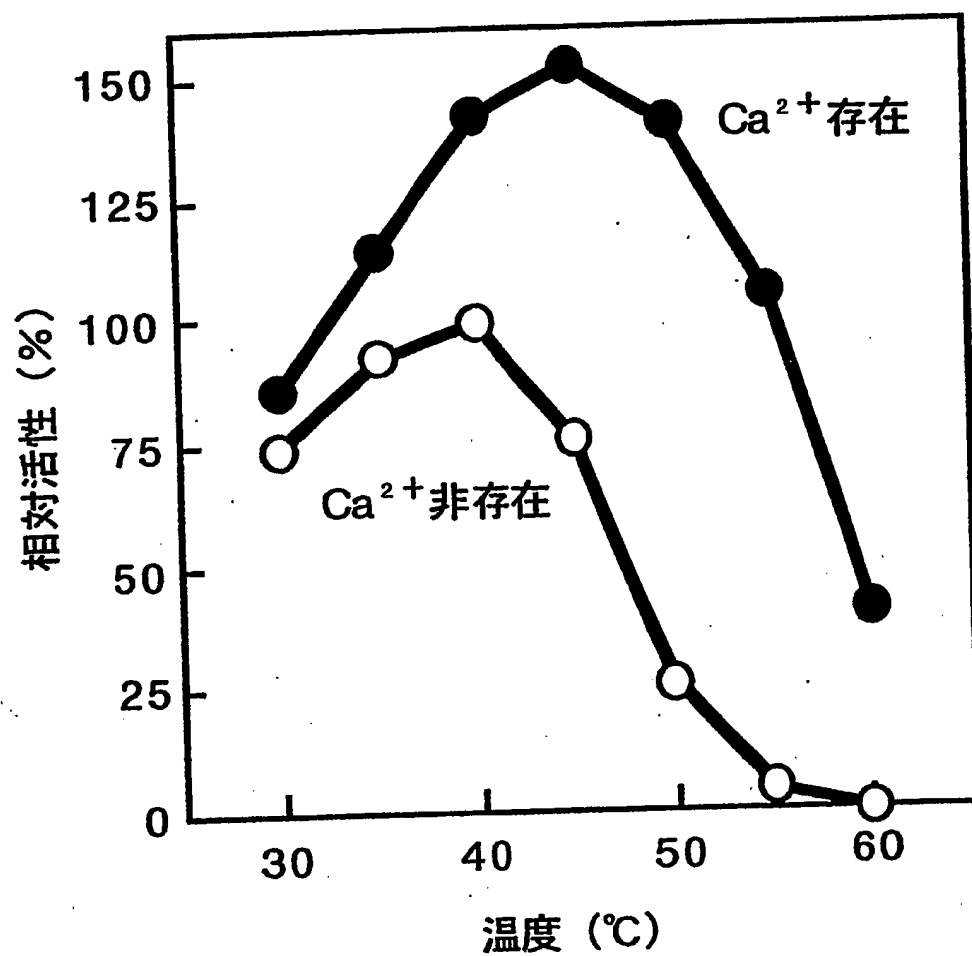
【図3】



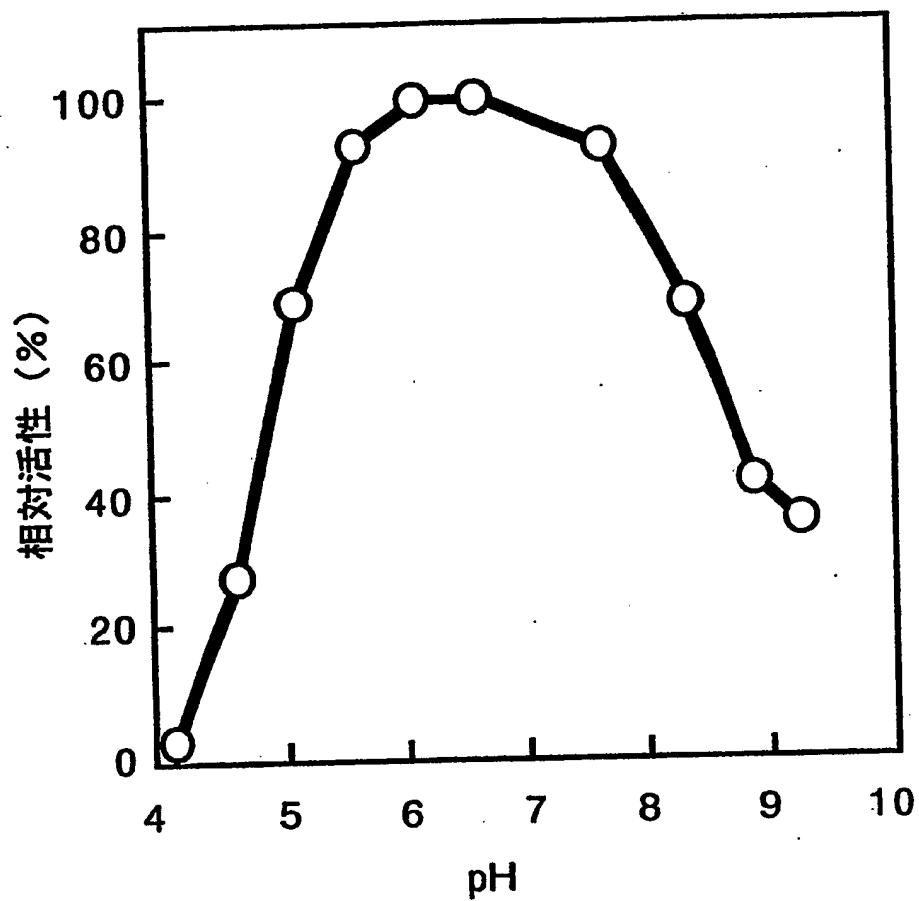
【図4】



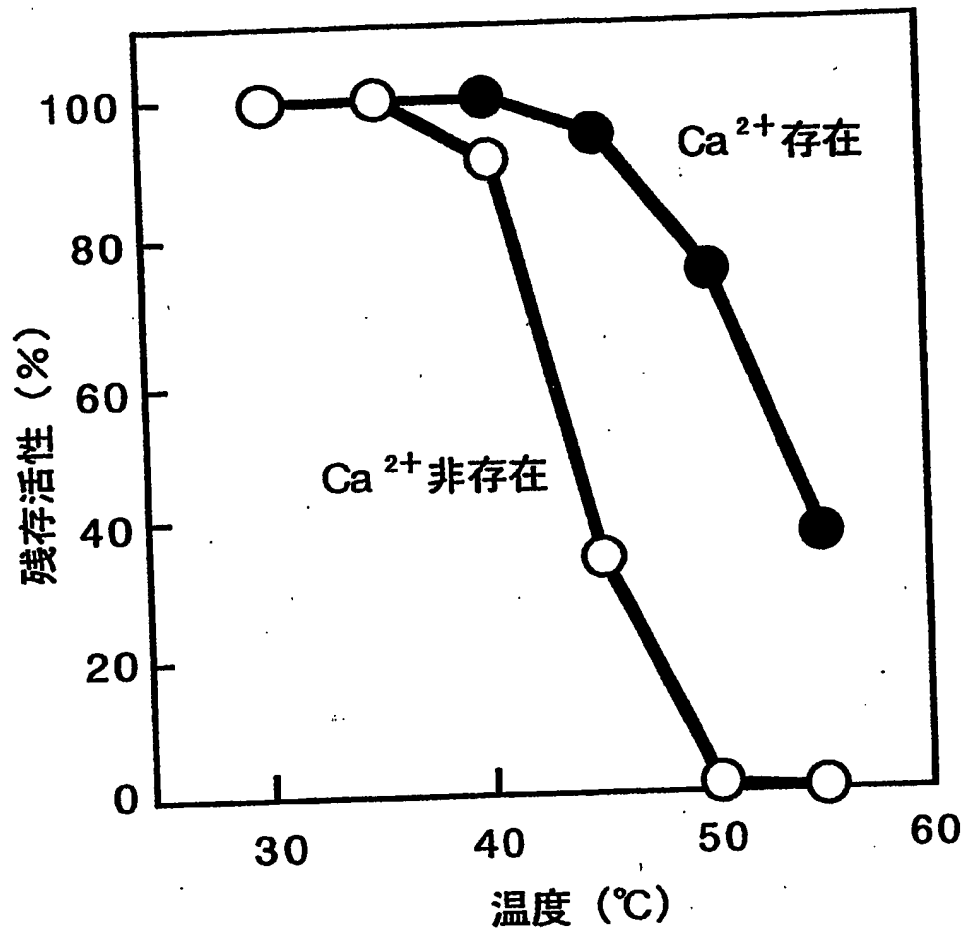
【図5】



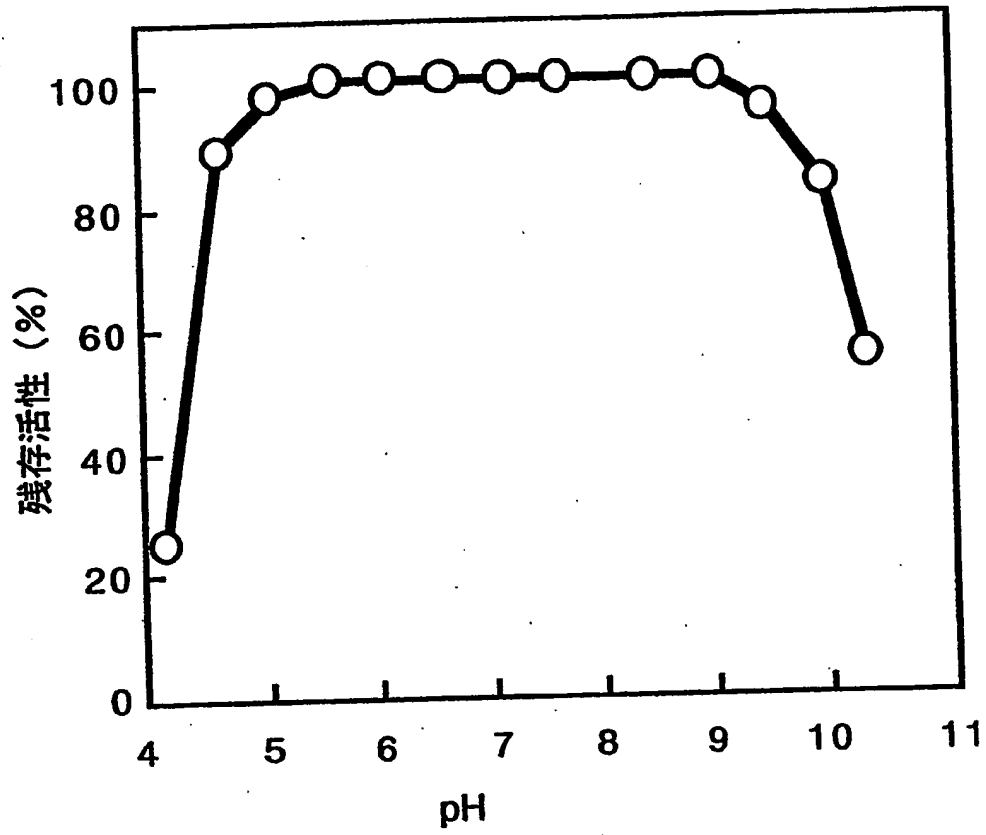
【図6】



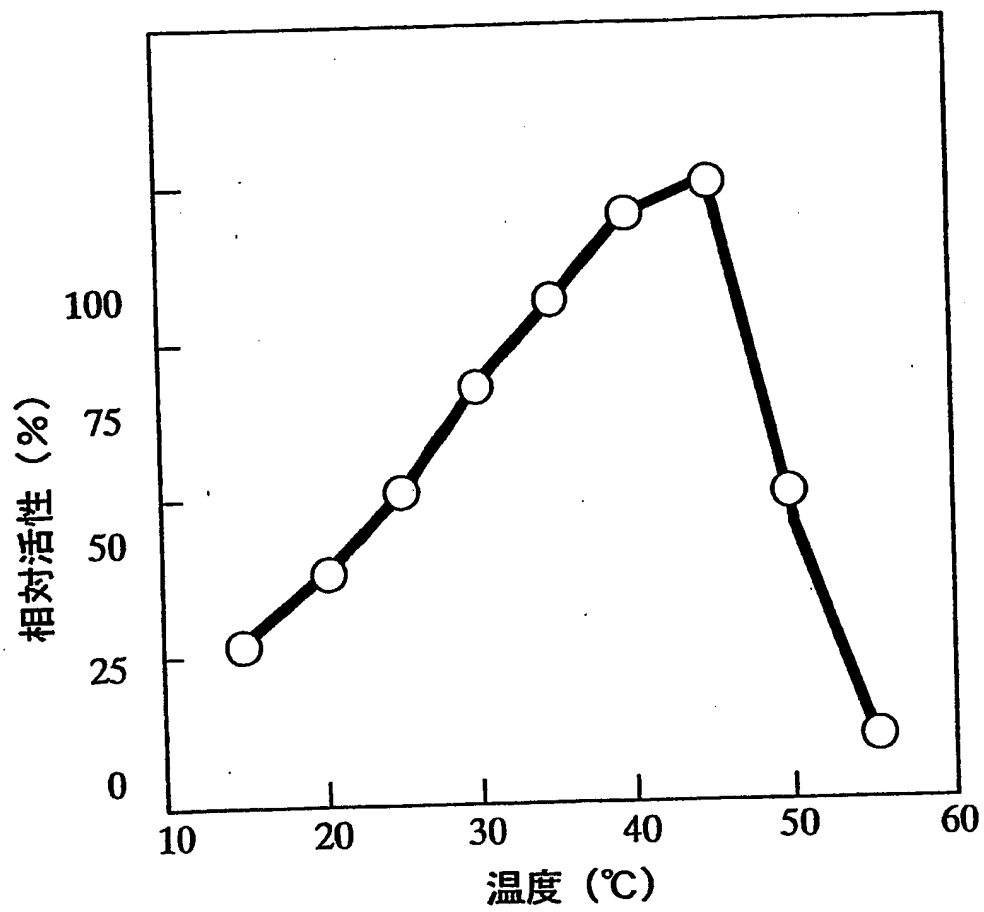
【図7】



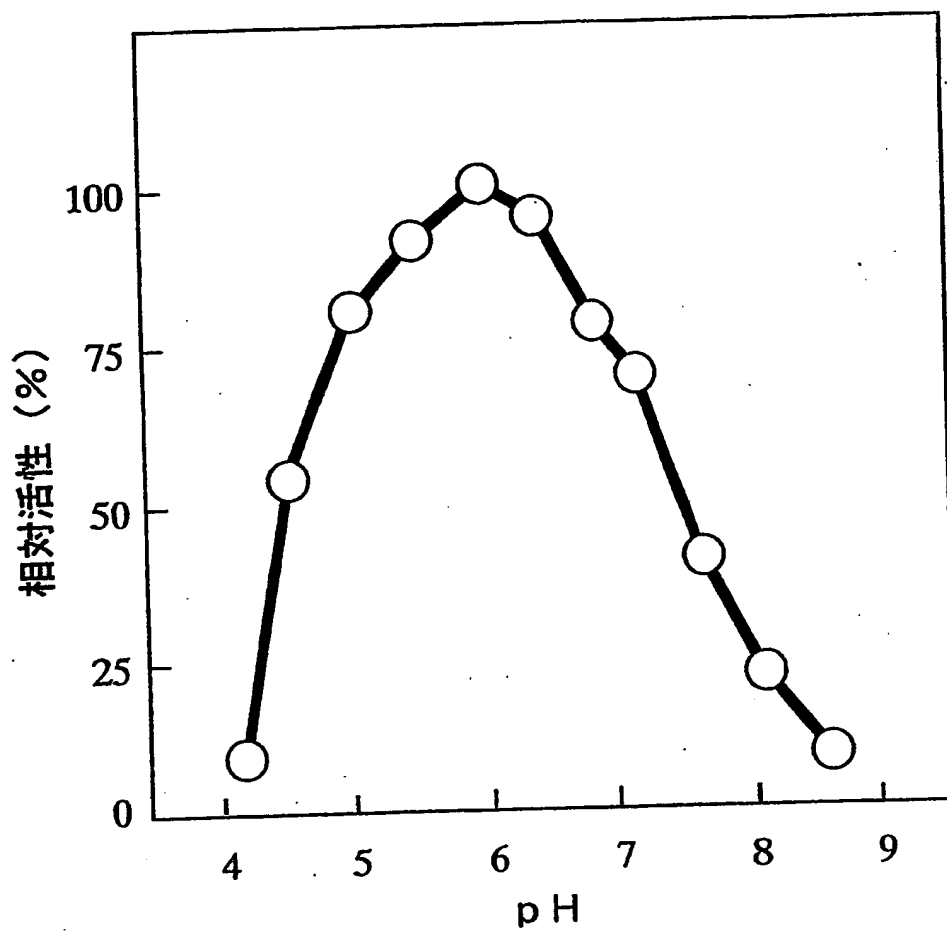
【図8】



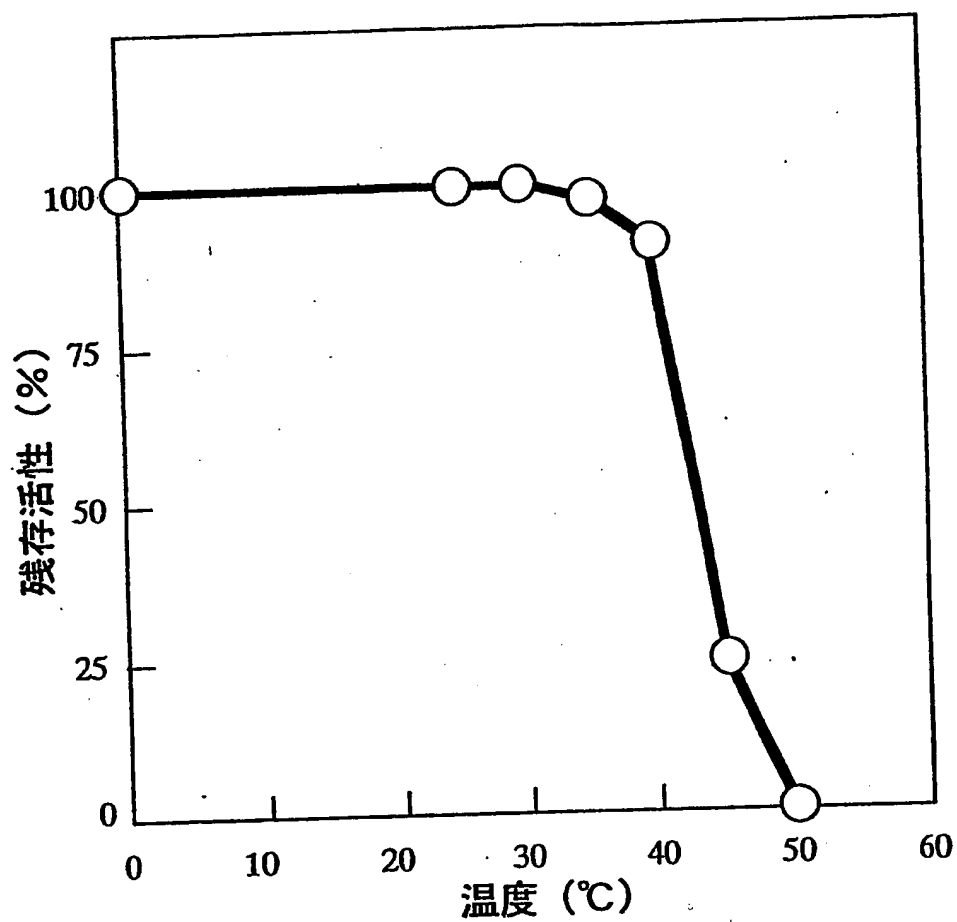
【図9】



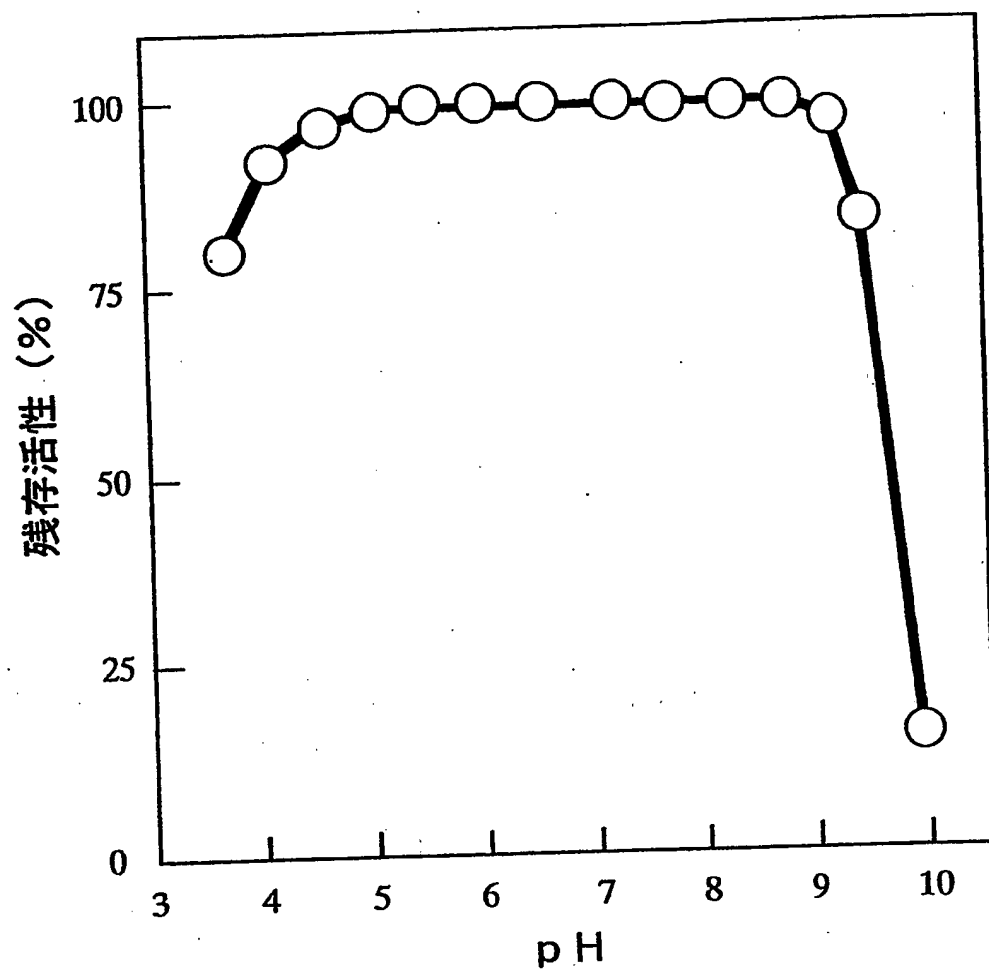
【図10】



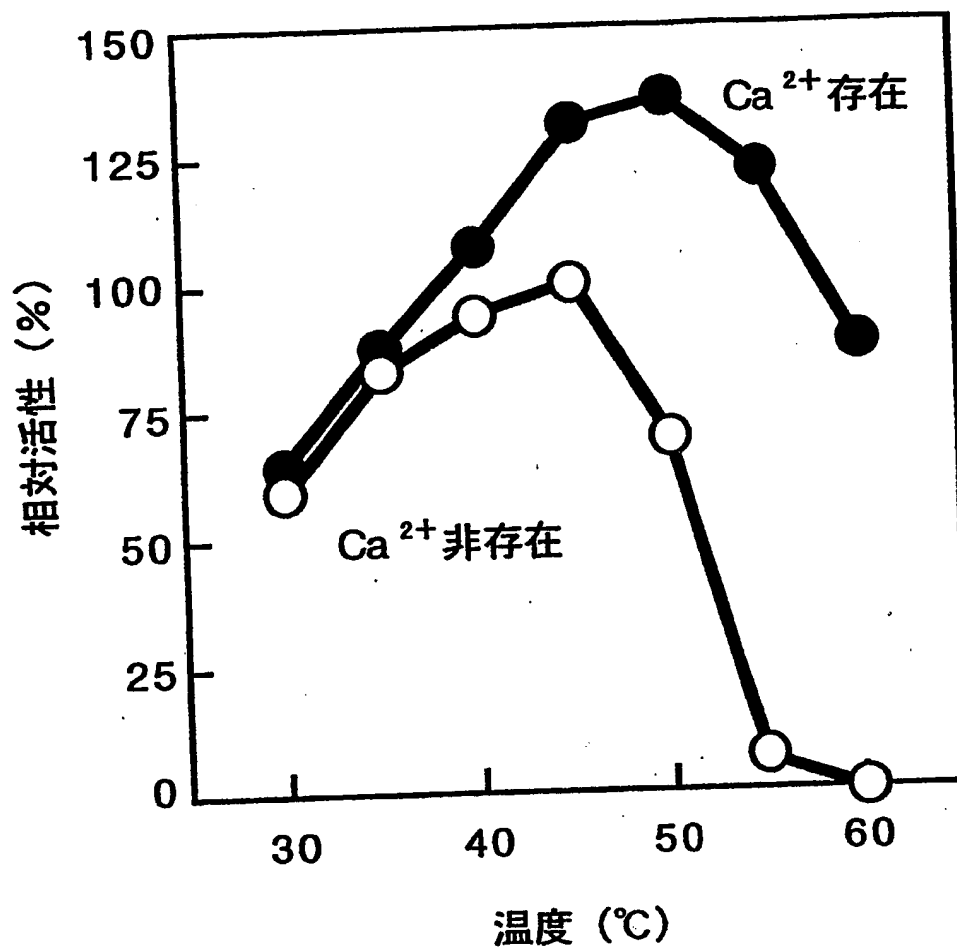
【図11】



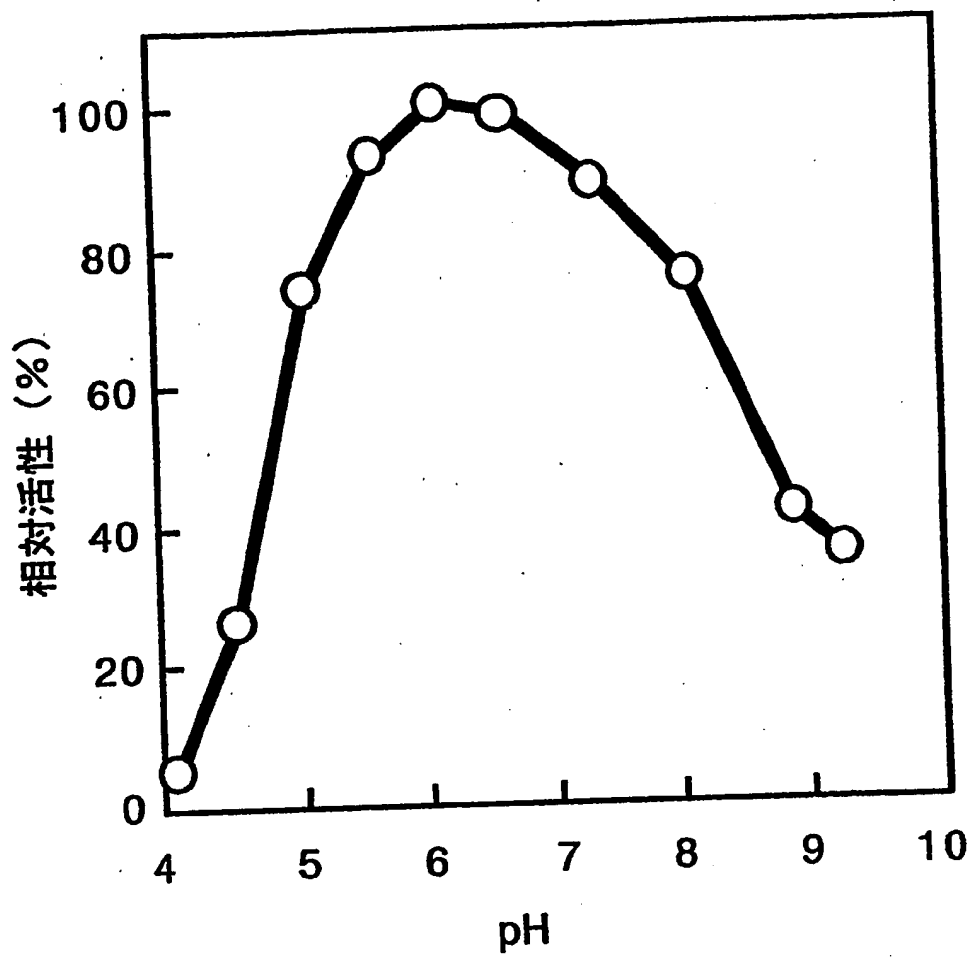
【図12】



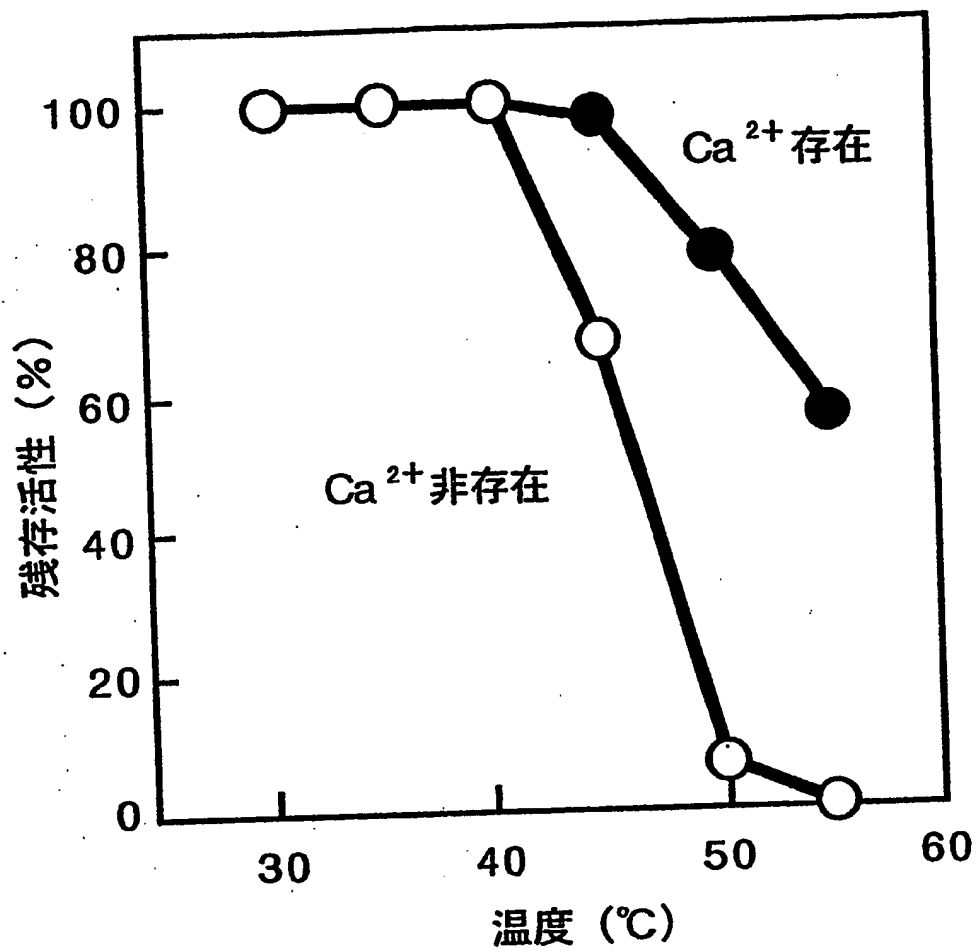
【図13】



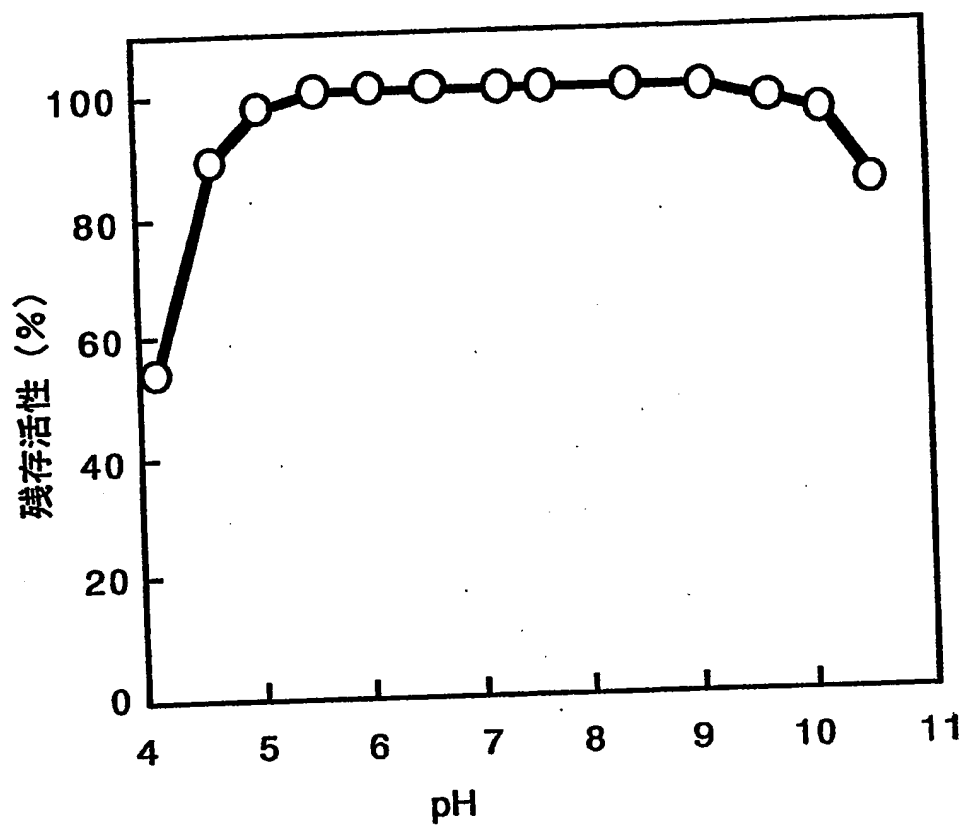
【図14】



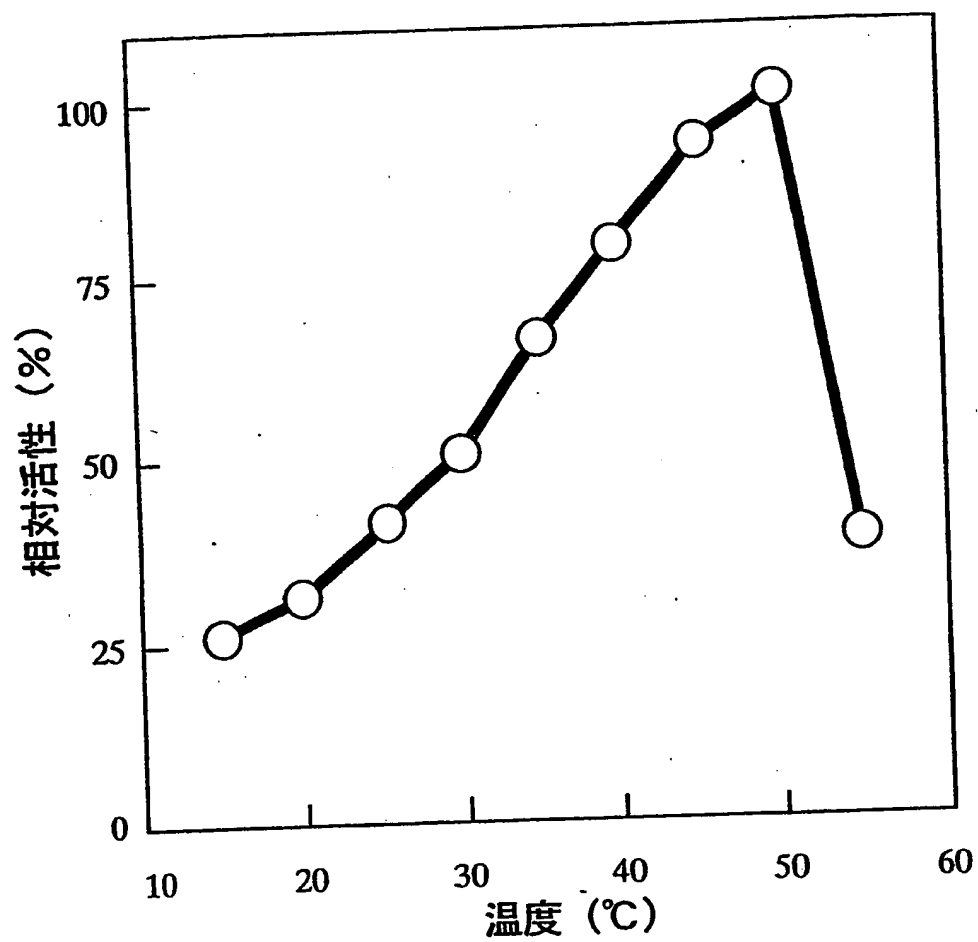
【図15】



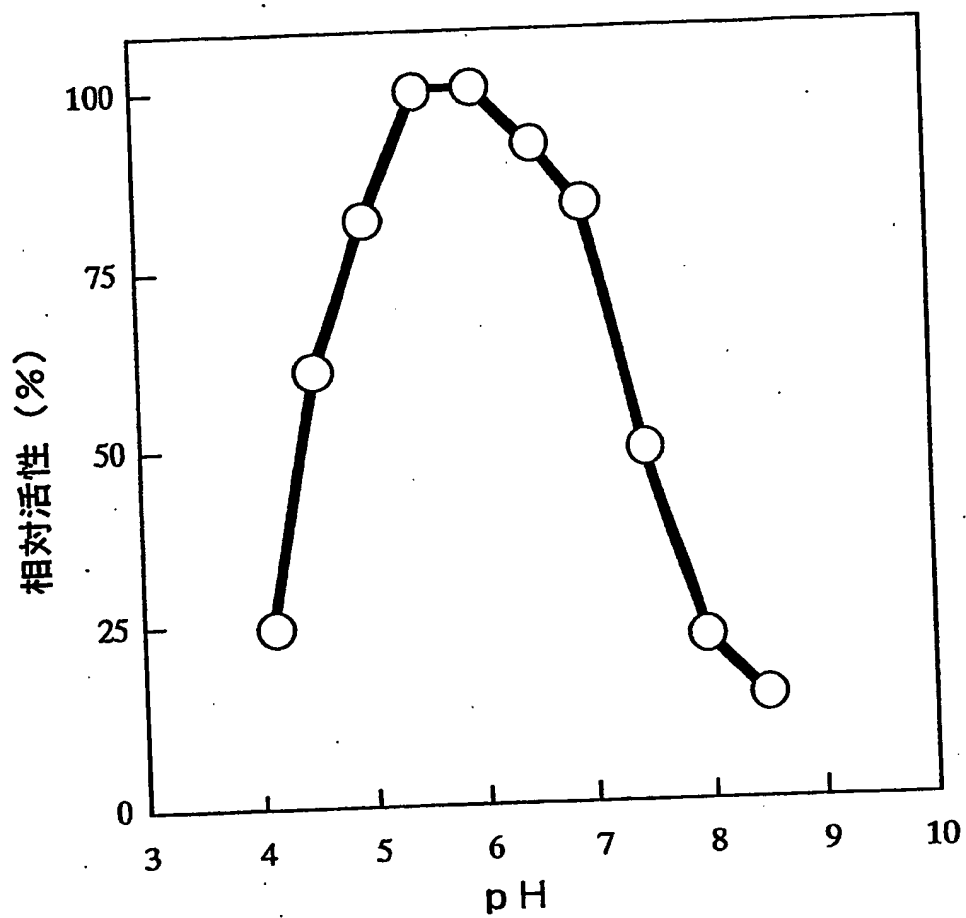
【図16】



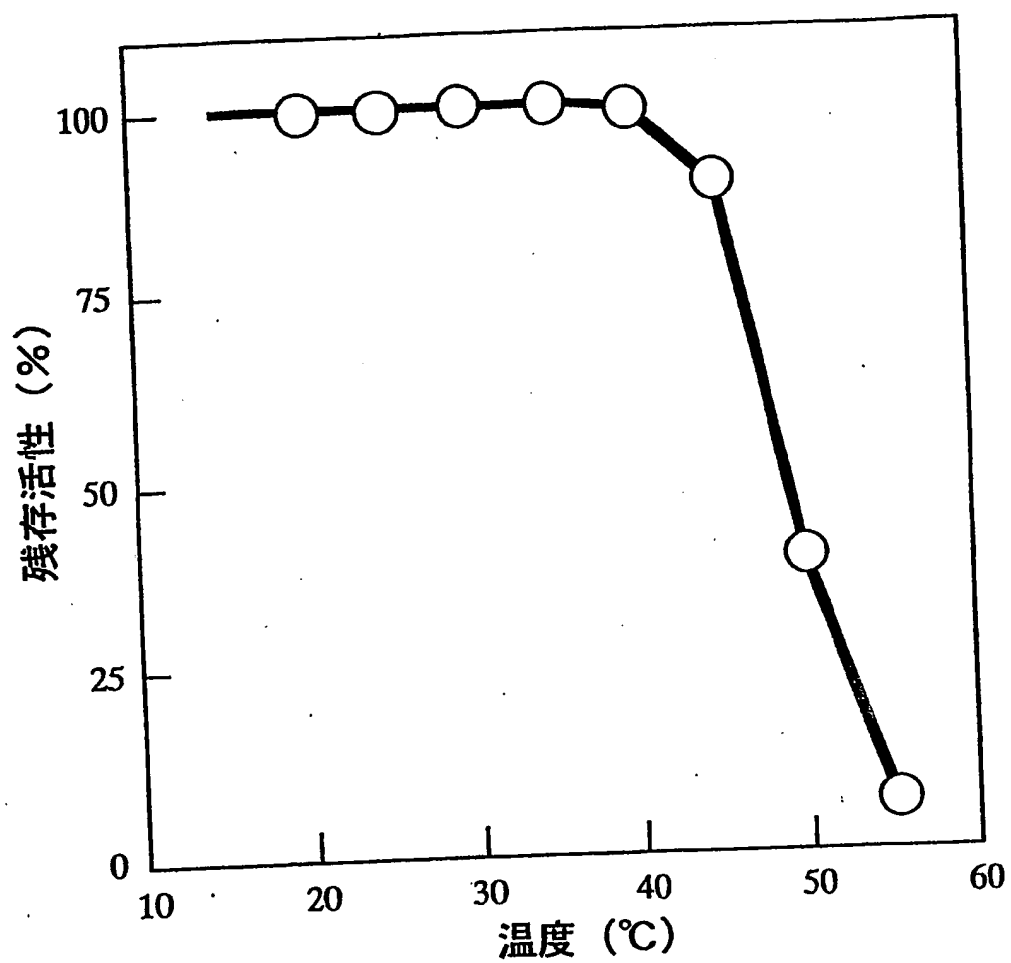
【図17】



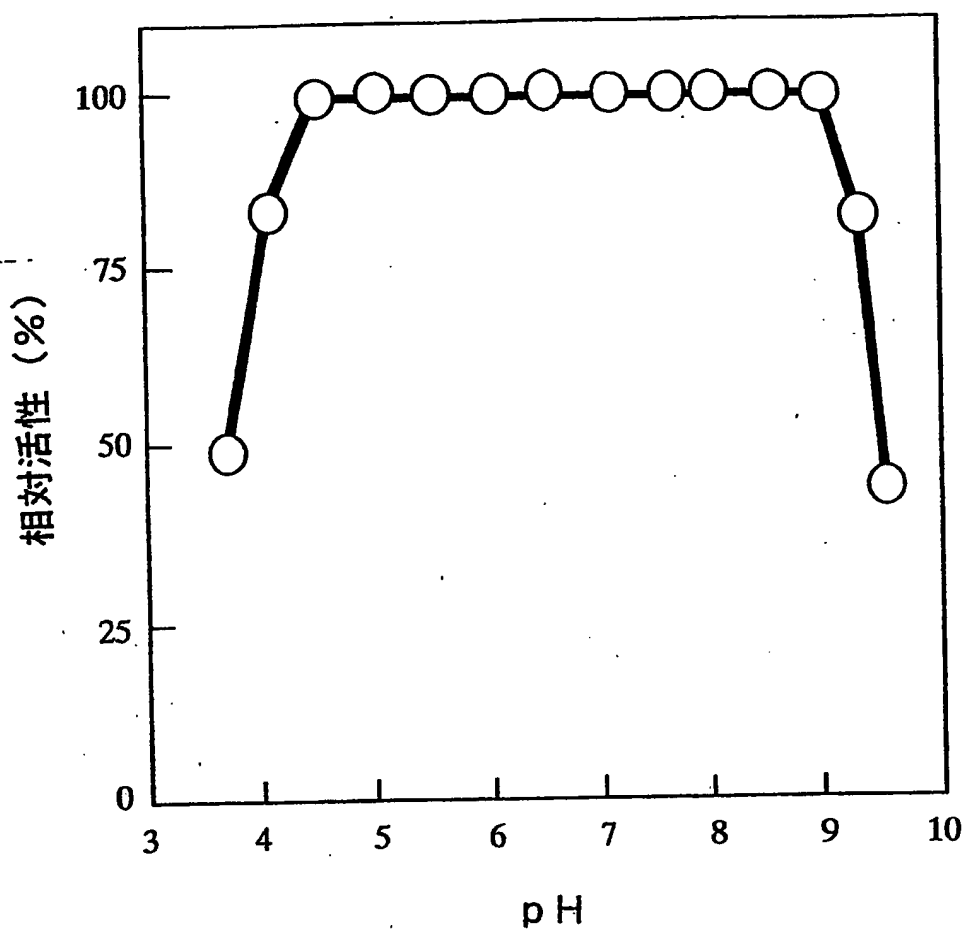
【図18】



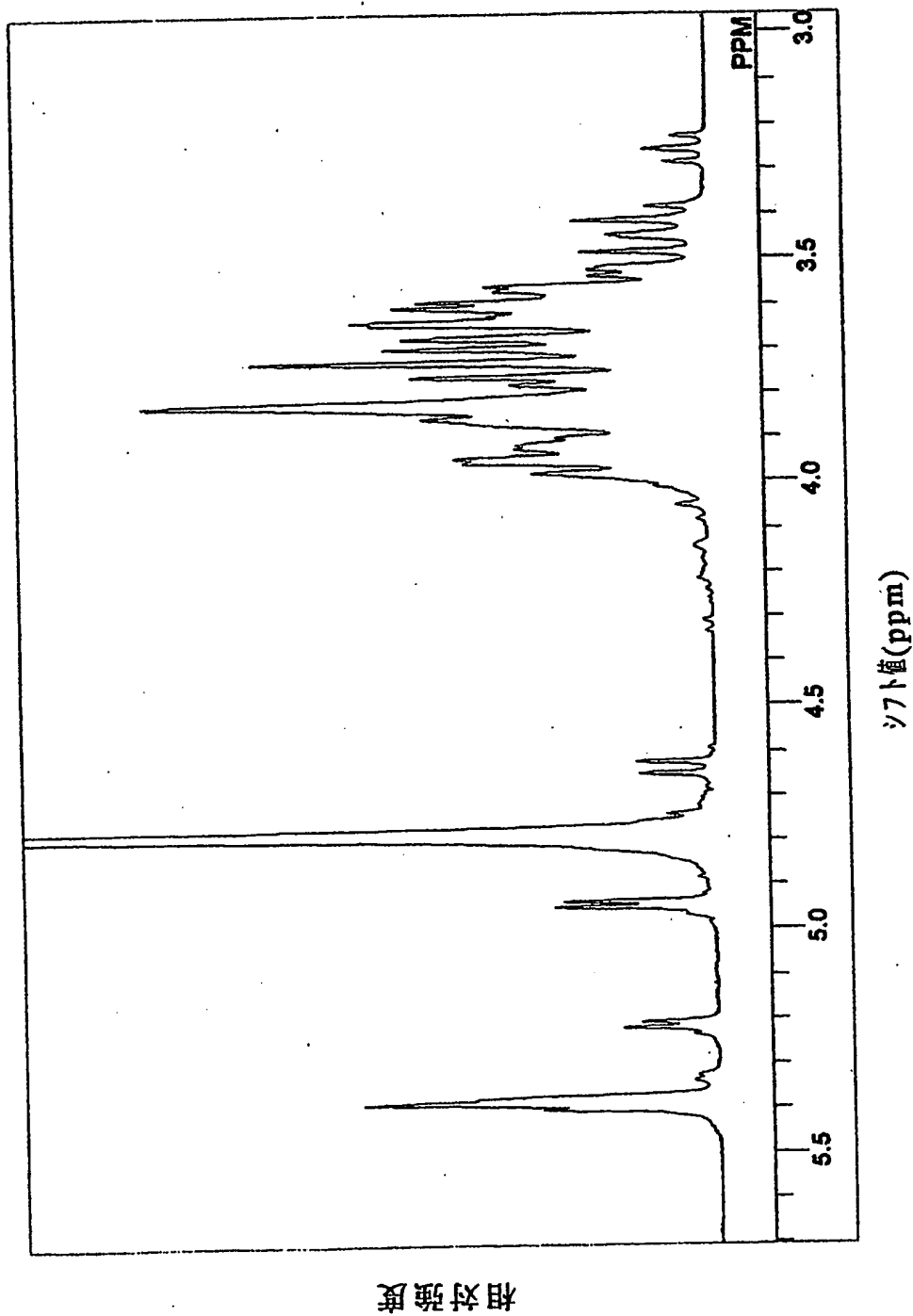
【図19】



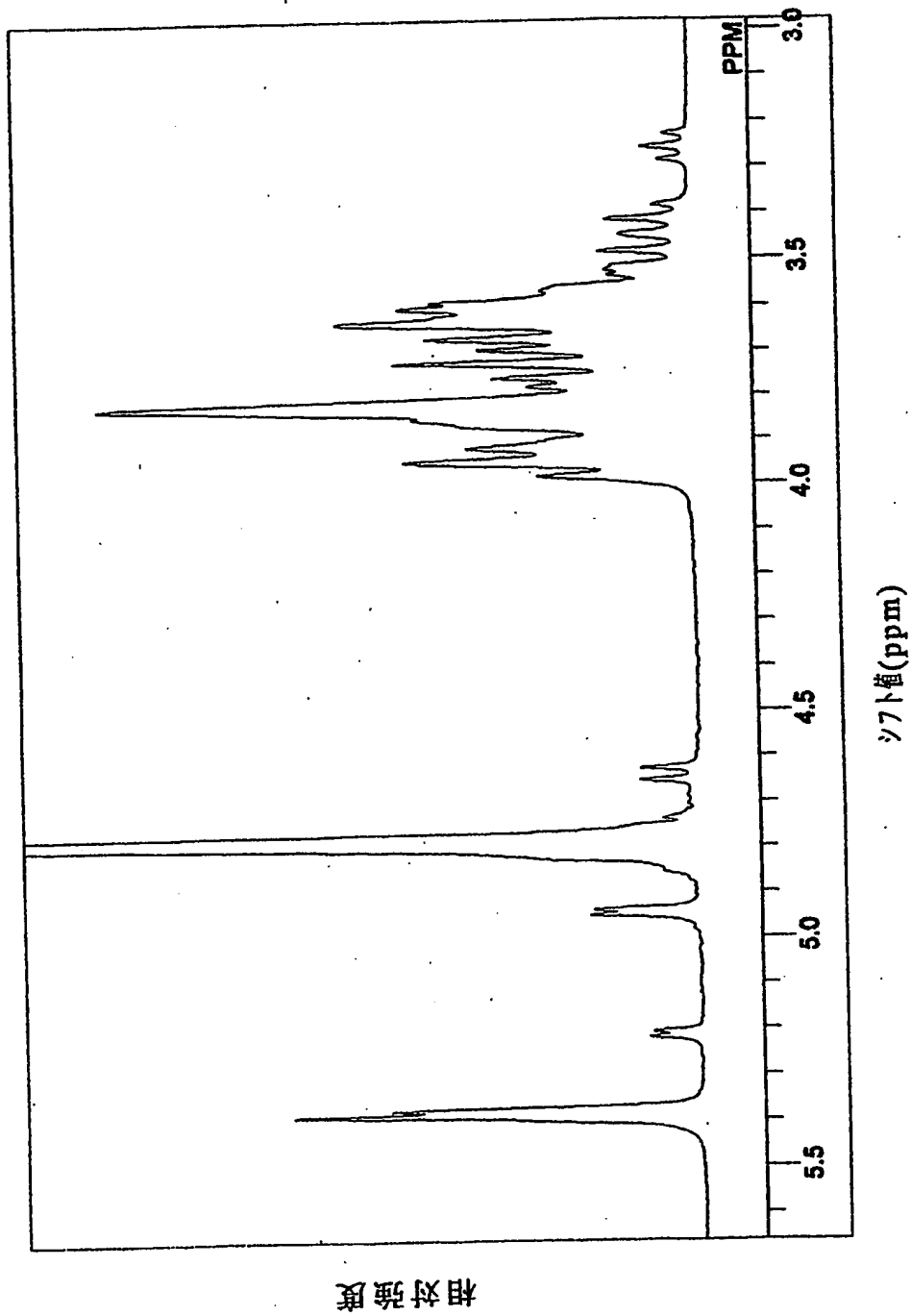
【図20】



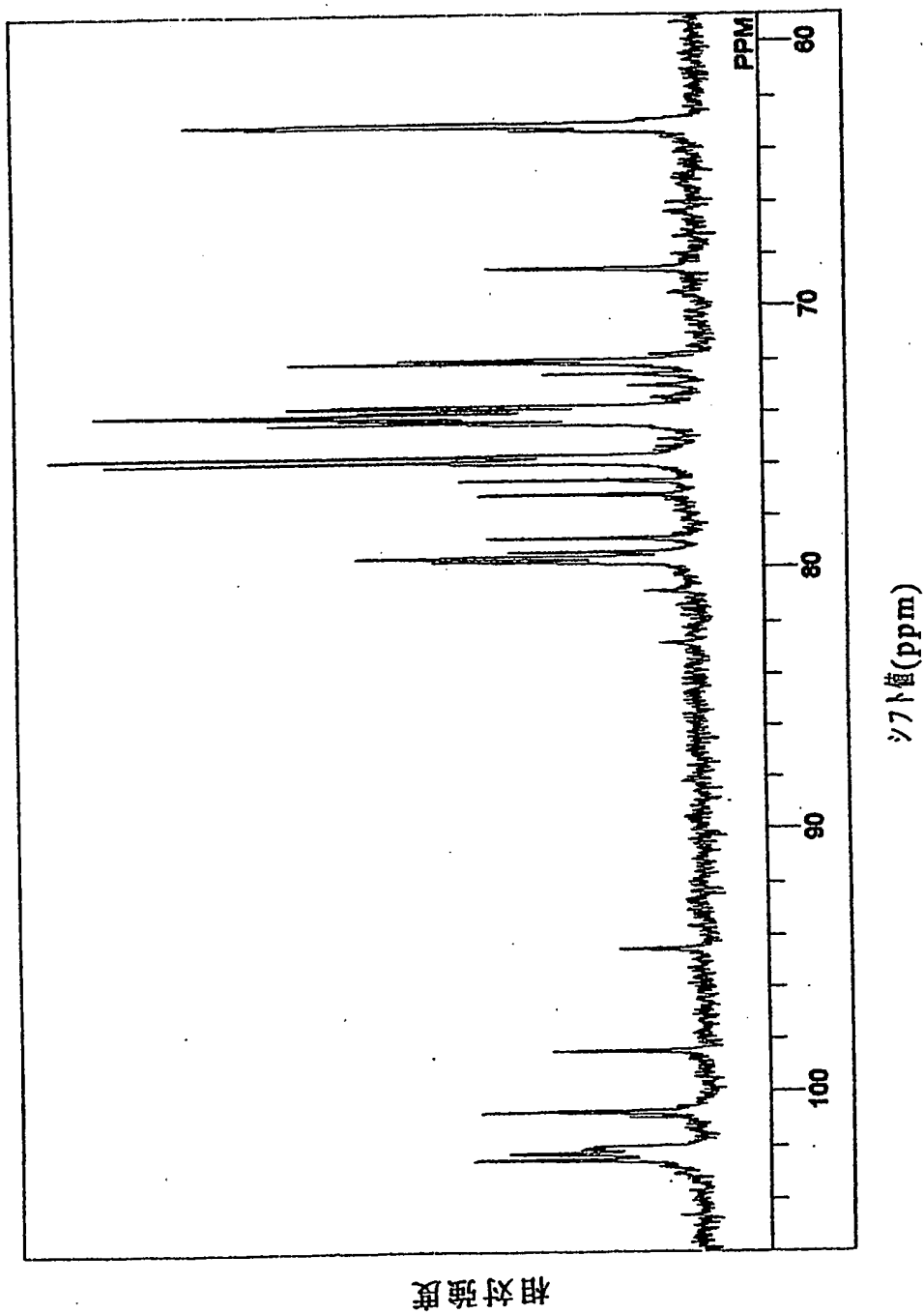
【図21】



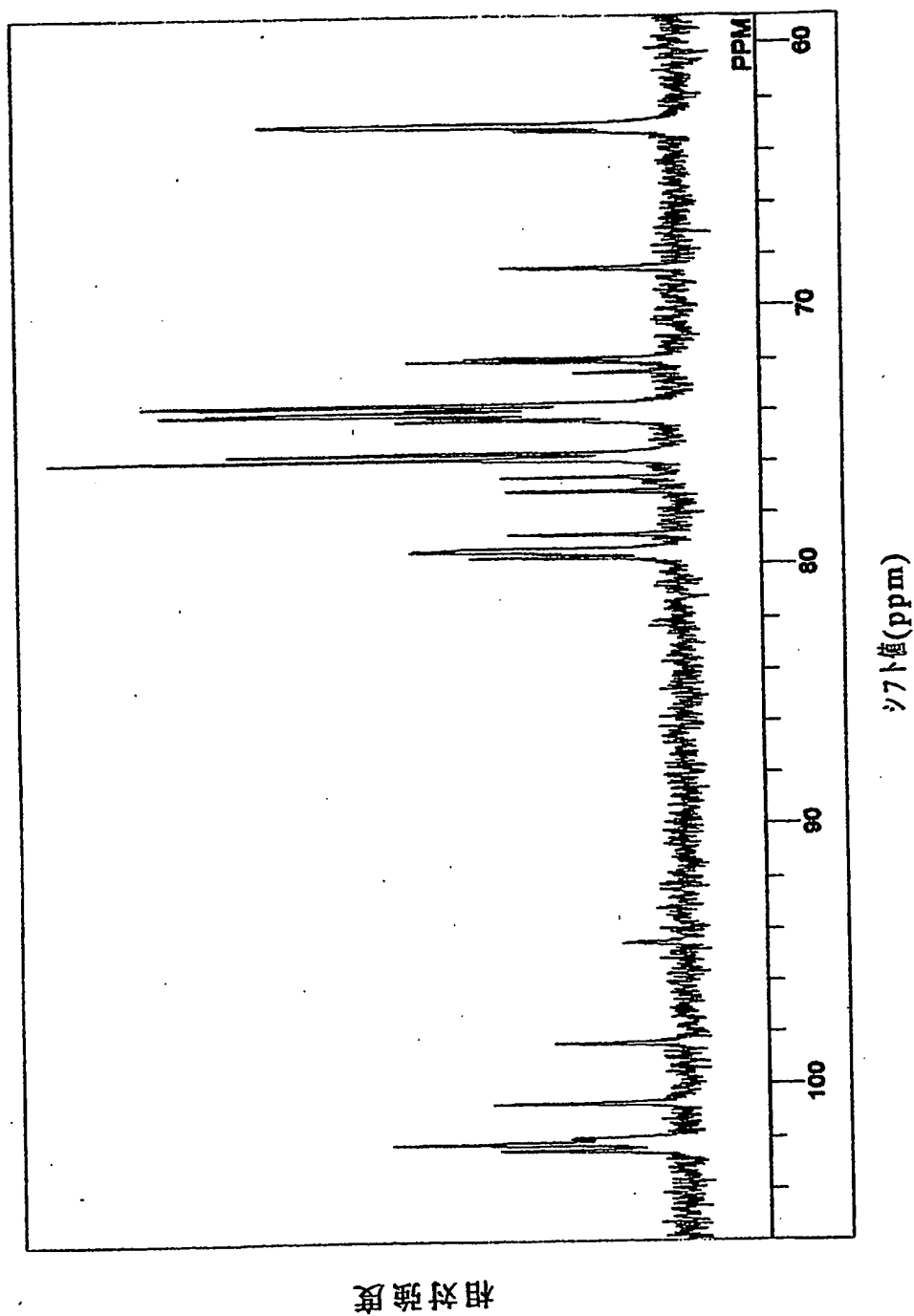
【図22】



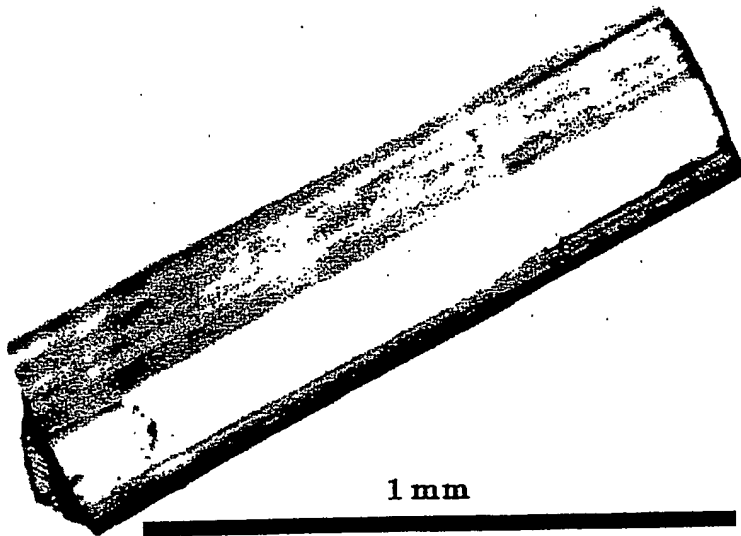
【図23】



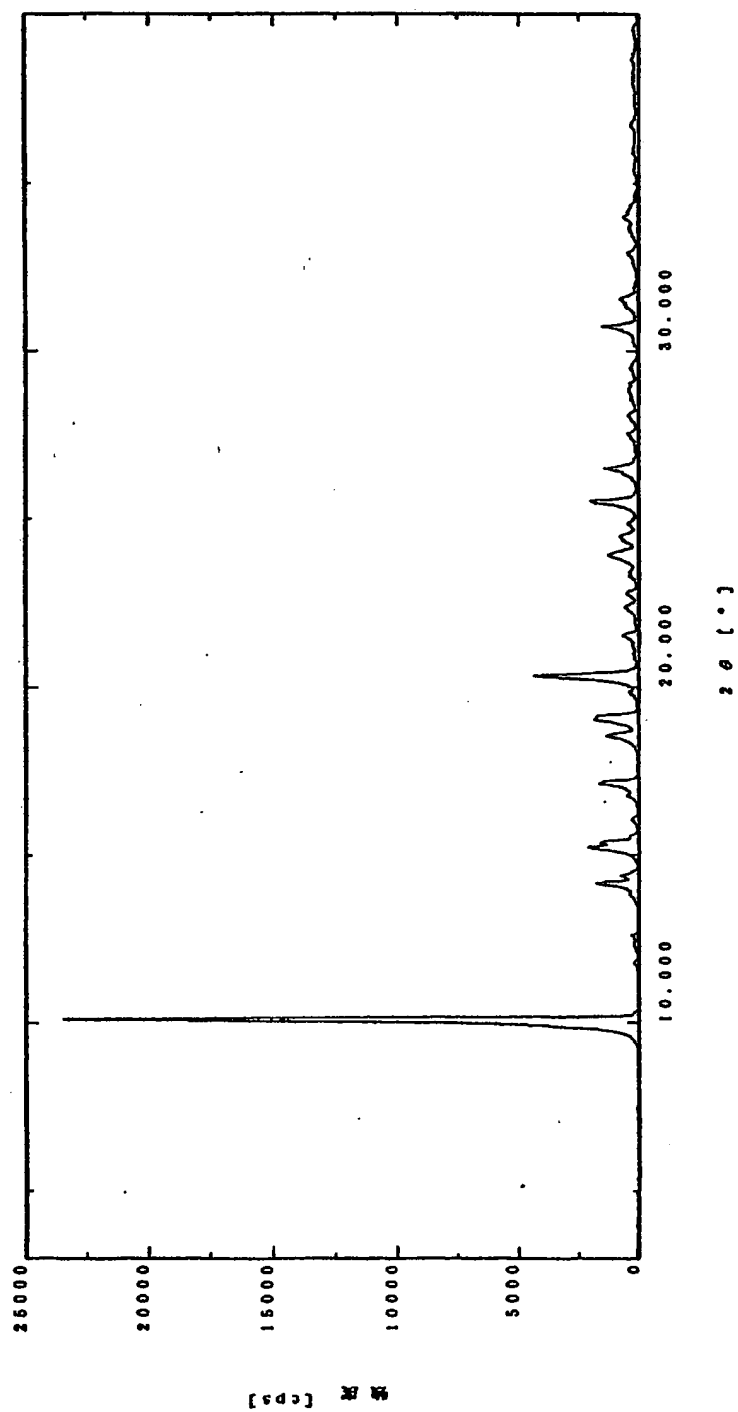
【図24】



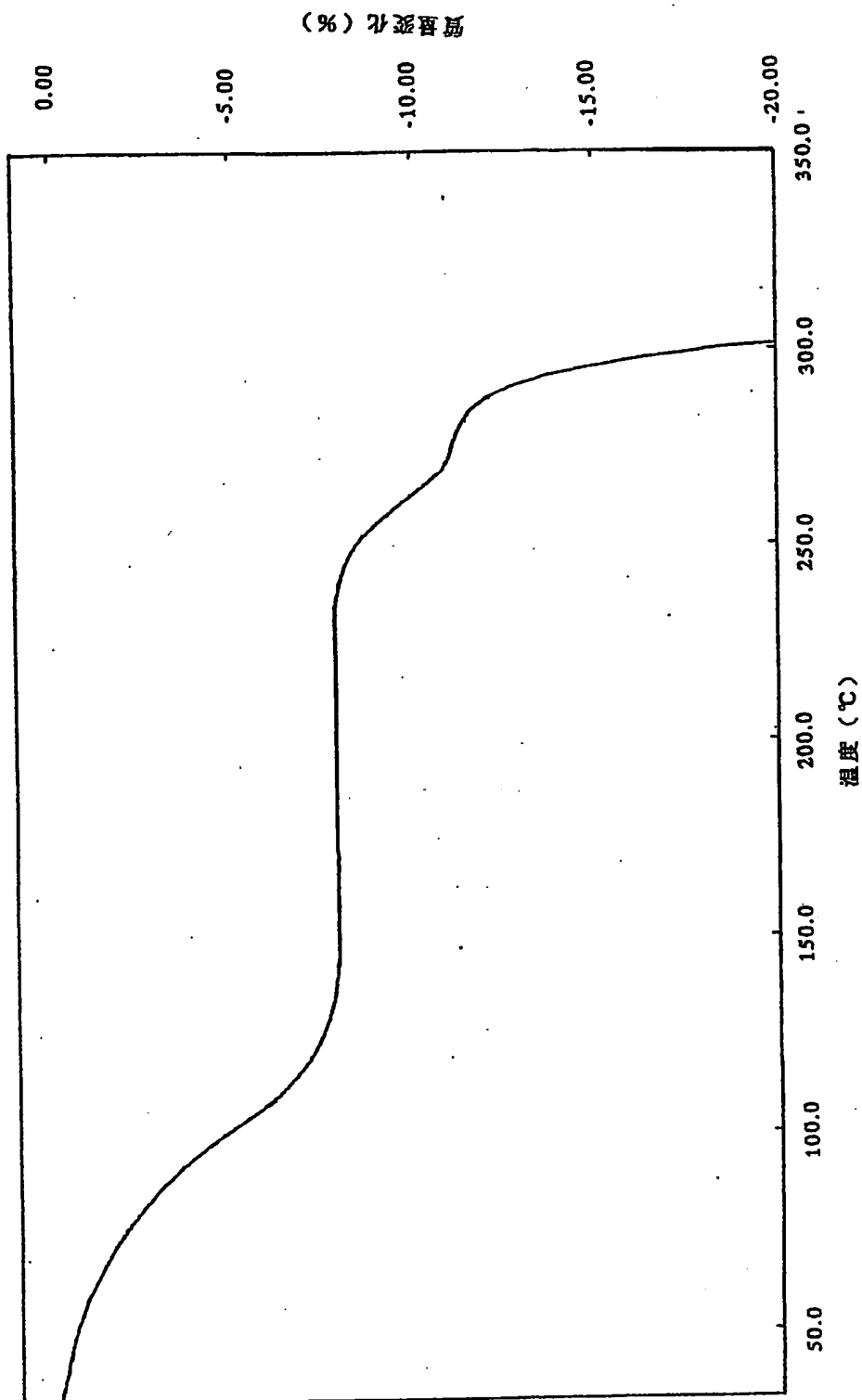
【図25】



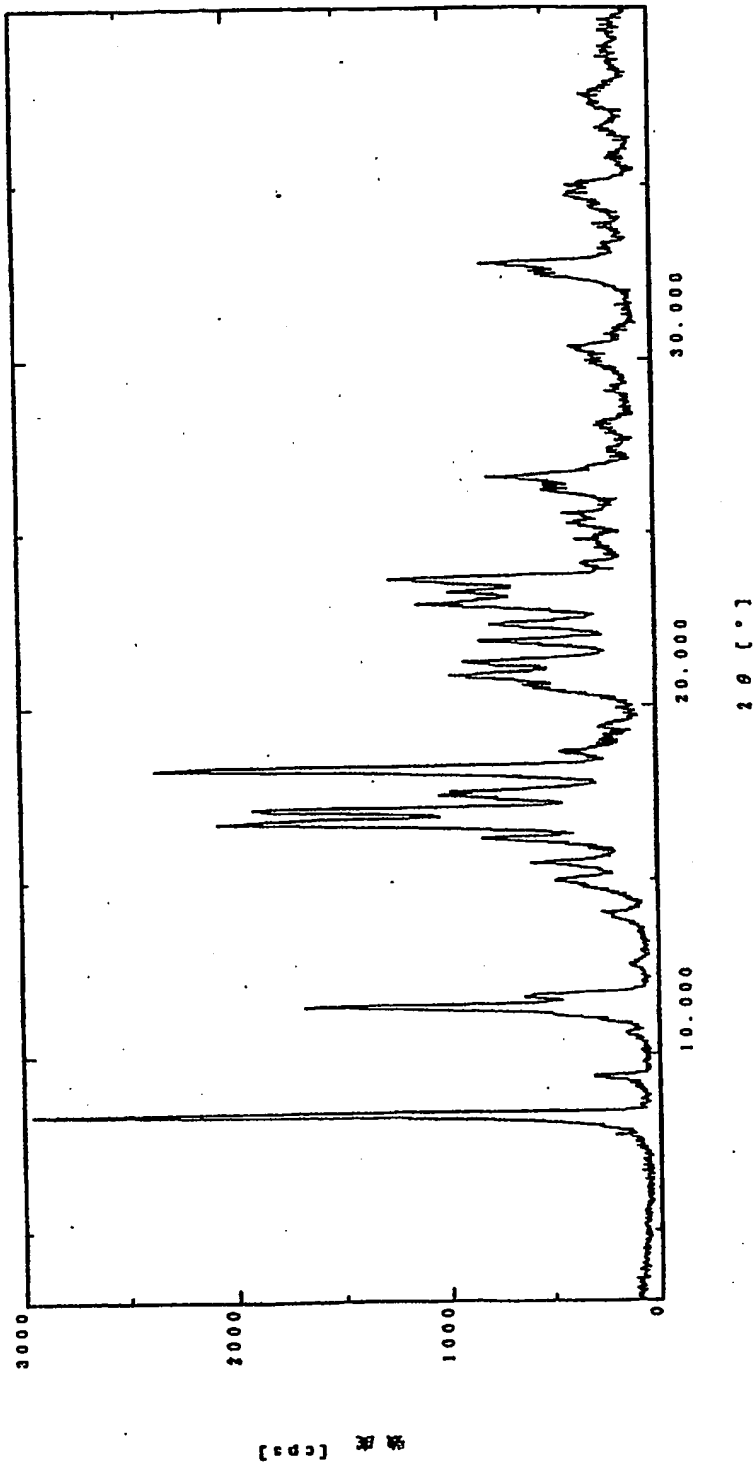
【図26】



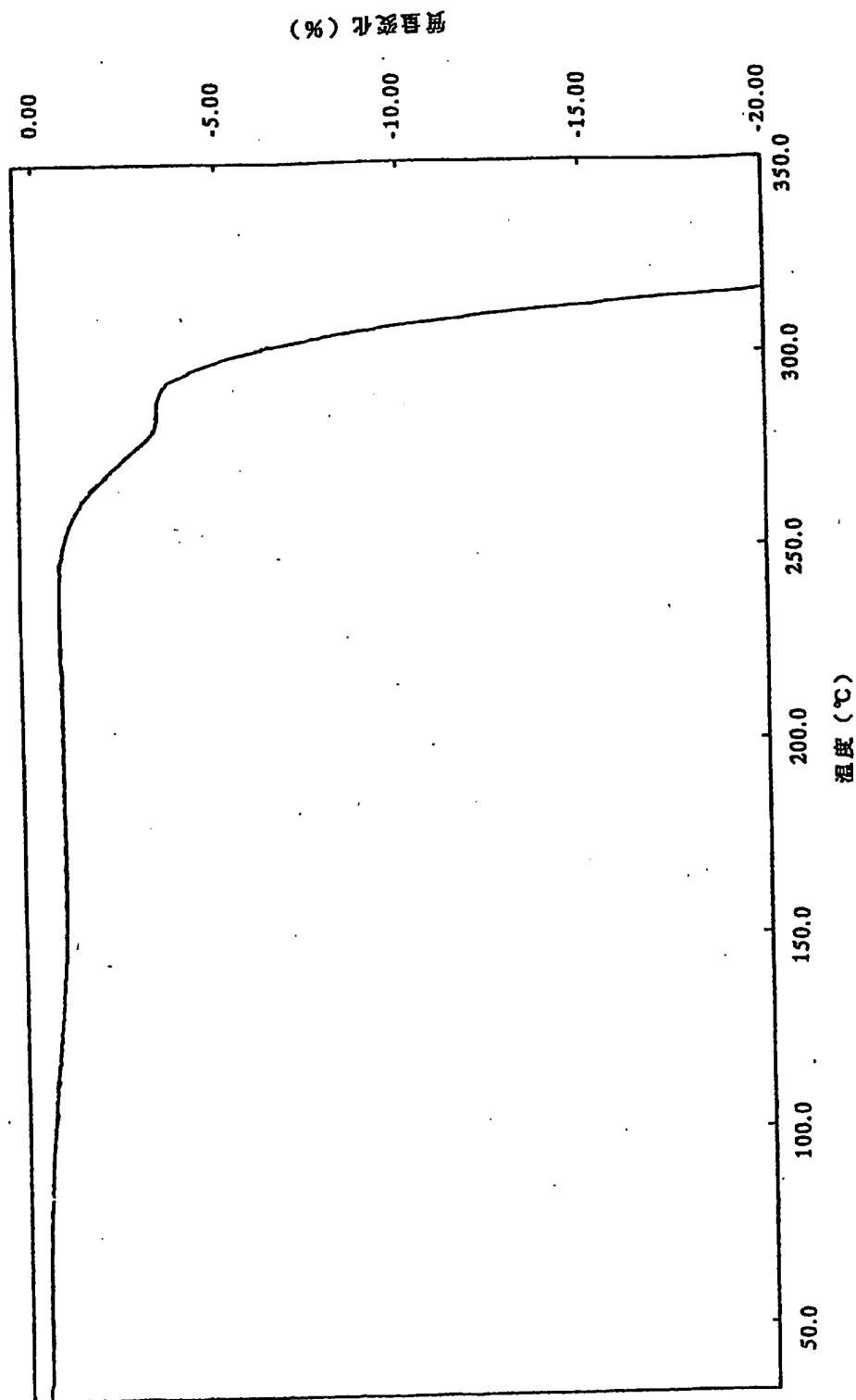
【図27】



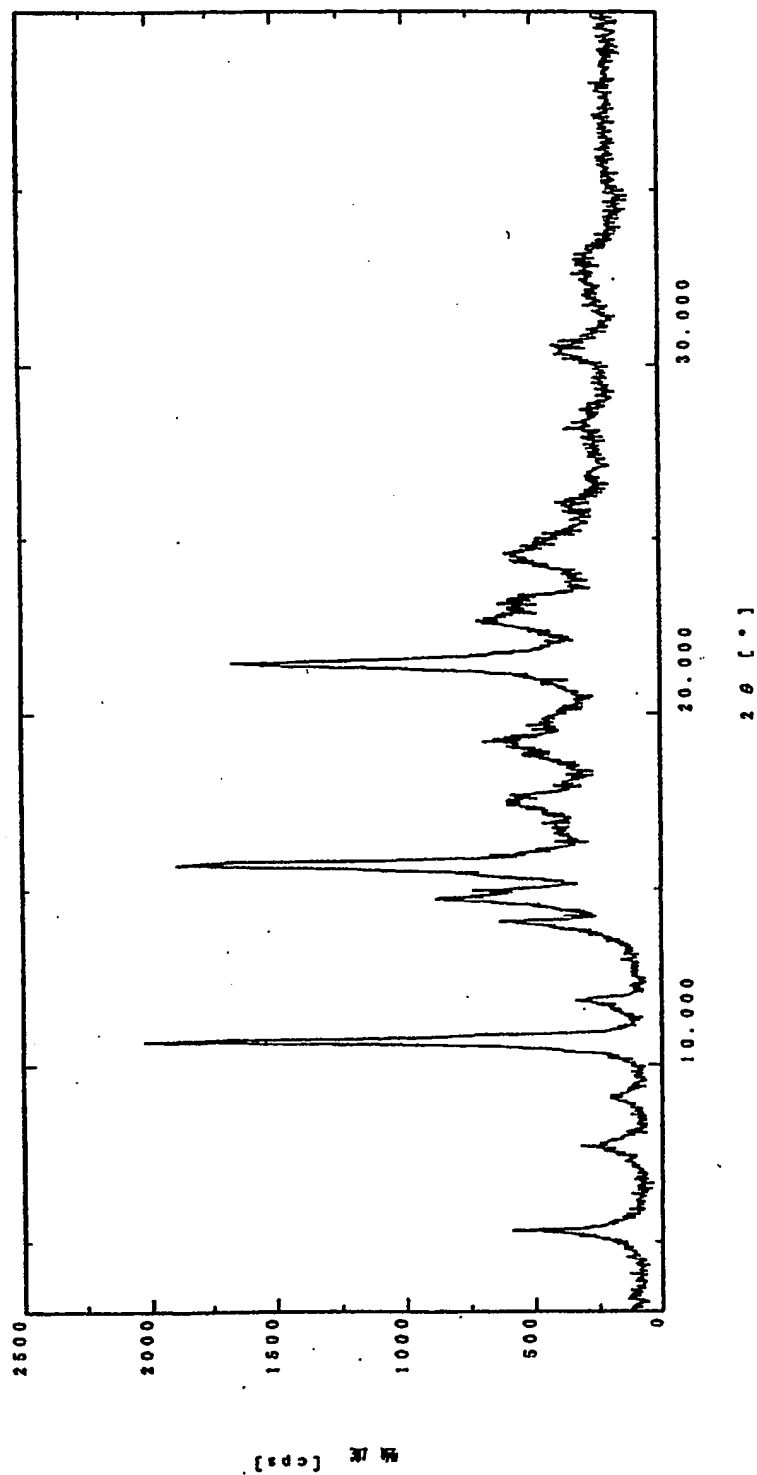
【図28】



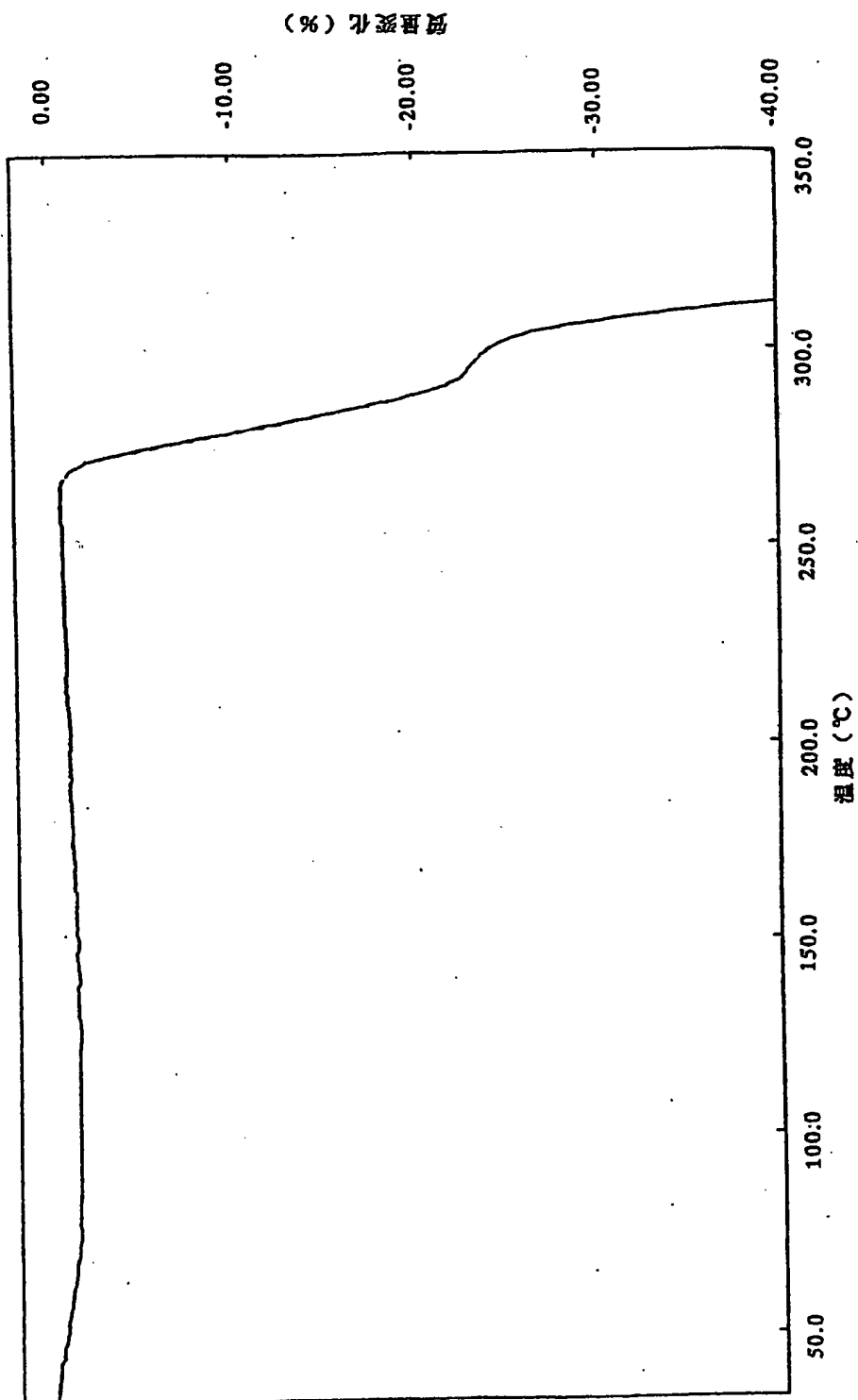
【図 29】



【図30】



【図32】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とその製造方法、当該酵素を用いて得られる環状四糖またはこれを含む糖質、およびそれらの用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 非還元性末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質から、還元力を実質的に増加することなく α -グルコシル転移することによって、非還元性末端の結合様式として α -1, 6グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質を生成する α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、当該酵素を用いた α -グルコシル転移方法、 α -イソマルトシルグルコ糖質の生成方法、加えて、当該酵素と α -イソマルトシル転移酵素とを併用したサイクロ { $\rightarrow 6$ }- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 6)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 3)- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow) の構造を有する環状四糖の製造方法、並びにこれら糖質、およびそれらの用途を確立することにより解決する。

【選択図】 なし

特2000-233364

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-233364
受付番号	50000977386
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成12年 9月22日

<認定情報・付加情報>
【提出日】

平成12年 8月 1日

次頁無

特2000-233364

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000155908]

1. 変更年月日

1998年10月21日

[変更理由]

住所変更

住 所

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

氏 名

株式会社林原生物化学研究所